

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

PCT

世界知的所有機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C07K 16/40, C12P 21/08, G01N 33/53, A61K 39/395	A1	(11) 国際公開番号 WO00/18805 (43) 国際公開日 2000年4月6日(06.04.00)																												
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05350 (22) 国際出願日 1999年9月29日(29.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/291501 1998年9月29日(29.09.98) JP 特願平10/291503 1998年9月29日(29.09.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)(JP/JP) 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 花井陳雄(HANAI, Nobuo)(JP/JP) 〒229-0011 神奈川県相模原市大野台7-9-15 Kanagawa, (JP) 古谷安希子(FURUYA, Akiko)(JP/JP) 〒194-0033 東京都町田市木曽町1464-49 Tokyo, (JP) (74) 代理人 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ZA. 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書																													
(54)Title: NOVEL ANTIBODIES, DRUGS CONTAINING THESE ANTIBODIES AND METHODS FOR SCREENING COMPOUNDS BY USING THESE ANTIBODIES (54)発明の名称 新規抗体、該抗体を含有する医薬品及び該抗体を用いた化合物のスクリーニング方法 <div data-bbox="503 1260 1088 1638"><table border="1"><thead><tr><th>Sample</th><th>Mouse MT4-MMP(2)</th><th>Human MT1-MMP</th><th>E. coli cellular protein</th></tr></thead><tbody><tr><td>KA2560</td><td>3.1</td><td>0.1</td><td>0.1</td></tr><tr><td>KA2561</td><td>3.1</td><td>0.1</td><td>0.1</td></tr><tr><td>KA2562</td><td>3.0</td><td>0.1</td><td>0.1</td></tr><tr><td>KA2563</td><td>3.2</td><td>0.1</td><td>0.1</td></tr><tr><td>KA2564</td><td>3.0</td><td>0.9</td><td>0.1</td></tr><tr><td>KA2565</td><td>3.1</td><td>0.8</td><td>0.1</td></tr></tbody></table></div> (57) Abstract An antibody recognizing a novel transmembrane matrix metalloprotease polypeptide [MT4-MMP(2)] which has a physiological activity different from MT4-MMP reported hitherto; preventives, diagnostics and remedies for various diseases such as arthrosis deformans, rheumatoid arthritis, asthma, autoimmune diseases and atopic dermatitis which contain the above antibody; a method for screening an MT4-MMP(2) inhibitor or activator by using the above antibody, etc. An antibody recognizing a novel human and mouse transmembrane matrix metalloprotease polypeptide MT5-MMP which has a physiological activity; preventives, diagnostics and remedies for various diseases such as arthrosis deformans, rheumatoid arthritis, asthma, autoimmune diseases, atopic dermatitis, brain failure such as cerebral stroke, and Alzheimer's disease which contain the above antibody; a method for screening an MT5-MMP inhibitor or activator by using the above antibody, etc.			Sample	Mouse MT4-MMP(2)	Human MT1-MMP	E. coli cellular protein	KA2560	3.1	0.1	0.1	KA2561	3.1	0.1	0.1	KA2562	3.0	0.1	0.1	KA2563	3.2	0.1	0.1	KA2564	3.0	0.9	0.1	KA2565	3.1	0.8	0.1
Sample	Mouse MT4-MMP(2)	Human MT1-MMP	E. coli cellular protein																											
KA2560	3.1	0.1	0.1																											
KA2561	3.1	0.1	0.1																											
KA2562	3.0	0.1	0.1																											
KA2563	3.2	0.1	0.1																											
KA2564	3.0	0.9	0.1																											
KA2565	3.1	0.8	0.1																											

(57)要約

本発明は、従来報告されているMT 4-MMPとは異なり、生理的に活性を持った新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド〔MT 4-MMP (2)〕を認識する抗体、該抗体を含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎等の各種疾患の予防薬、診断薬および治療薬、および該抗体を用いたMT 4-MMP (2)の阻害薬や活性化薬のスクリーニング法等を提供する。

また、本発明の第2の課題は、生理的に活性を持ったヒトおよびマウスの新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼMT 5-MMPポリペプチドを認識する抗体、該抗体を含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病等の各種疾患の予防薬、診断薬および治療薬、および該抗体を用いたMT 5-MMPの阻害薬や活性化薬のスクリーニング法等を提供することにある。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LL	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	CN	ギニア・ビサウ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	CW	キニア	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

新規抗体、該抗体を含有する医薬品及び
該抗体を用いた化合物のスクリーニング方法

技 術 分 野

本発明は、新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドと特異的に反応する抗体、該抗体を含有する医薬品、該抗体を用いた該ポリペプチドの発現を変動させる化合物または該ポリペプチドと結合する化合物のスクリーニング法に関する。

背 景 技 術

コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン等の複雑な成分から構成される細胞外マトリックスの分解には、金属イオンを活性中心に持つマトリックスメタロプロテアーゼと総称される一群の酵素（以下MMPsと略記する）が関与している。

これまでMMPsとしては、間質型コラゲナーゼ（MMP-1）、ゼラチナーゼA（MMP-2）、ゼラチナーゼB（MMP-9）、ストロメライシン1（MMP-3）、マトリライシン（MMP-7）、好中球コラゲナーゼ（MMP-8）、ストロメライシン2（MMP-10）、ストロメライシン3（MMP-11）、メタロエラスターゼ（MMP-12）、コラゲナーゼ3（MMP-13）、膜貫通型MMP-1（MT1-MMPまたはMMP-14）、膜貫通型MMP-2（MT2-MMPまたはMMP-15）、膜貫通型MMP-3（MT3-MMPまたはMMP-16）、膜貫通型MMP-4（MT4-MMPまたはMMP-17）等が報告されている〔蛋白質核酸酵素, 42, 2386(1997)〕。これらのMMPsはファミリーを形成し、各MMPは基本的にN-末端プロペプチドドメイン、亜鉛イオンが結合する活性ドメイン、ヘモベキシン凝血酵素様ドメインの3つから構成されている。MMP-7においてはヘモベキシン凝血酵素様ドメインはない。膜貫通型では、ヘモベキシン凝血酵素様ドメインのC-末端に膜貫通ドメインと、細胞内ドメインを持っている。

ヒトMT4-MMP遺伝子の報告は既にあるが[Puente : Cancer Research, 56, 944 (1996)]、該遺伝子の塩基配列には翻訳開始領域が含まれておらず、単にMMPに類似したドメイン領域を有する塩基配列を含んでいるとして定義された遺伝子である。従って、該遺伝子はMT4-MMP完全長をコードしているとは考えにくい。

一方、変形性関節症の患者においてMT1-MMPの産生が促進されていることや[Am. J. Pathol., 151, 245 (1997)]、免疫や炎症反応に重要な白血球の組織への浸潤にMMPが重要なことや[J. Immunol., 156, 1 (1996)]、MMP阻害薬が肝炎を予防すること[Eur. J. Pharmacol., 341, 105 (1998)]、MMP阻害薬が角膜潰瘍の治療[日本眼科学会誌, 102, 270 (1998)]に有効であることが知られている。

また、癌の増殖、浸潤、転移にMMPが重要であることが知られており[蛋白質核酸酵素, 42, 2386(1997)]、MMP阻害薬が制癌活性をもつことが報告されている[SCRIP, 2349, 20 (1998)]。

更に、MT4-MMPは白血球に発現して、白血球の遊走と浸潤に関係があることが示唆されている。

以上のことから、MMPは変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の悪性度を診断する指標となるとともに、その阻害薬はこれらの疾患の予防と治療に用いることができる。

既に報告されているMT4-MMP [Cancer Research, 56, 944 (1996)] は、転写開始点を含まず、従来知られているMT1-MMP等の膜貫通型MMPに見られるようなドメイン構造を持っていないため、生体内では発現していない非生理的なペプチドをコードした配列である。

本発明の第1の課題は、従来報告されているMT4-MMPとは異なり、生理的に活性を持った新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド

〔以下、MT4-MMP(2)と略すこともある〕を認識する抗体、該抗体を含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球浸潤に伴う炎症の予防薬、診断薬および治療薬、および該抗体を用いたMT4-MMP(2)の阻害薬や活性化薬のスクリーニング法等を提供することにある。

また、本発明の第2の課題は、生理的に活性を持ったヒトおよびマウスの新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼMT5-MMPポリペプチドを認識する抗体、該抗体を含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の予防薬、診断薬および治療薬、および該抗体を用いたMT5-MMPの阻害薬や活性化薬のスクリーニング法等を提供することにある。

発 明 の 開 示

本発明者らは、既知のヒトMT4-MMPは本来の活性を有する蛋白質ではなく、活性を有する真のMT4-MMPが存在するとの推測の基に鋭意検討を行い、新規な真のMT4-MMP(以降MT4-MMP(2)と記載する)を見いだし、該ポリペプチドを認識する抗体を取得することにより本発明を完成するに至った。

また、本発明者らは、医薬用途として有用と考えられている既知の膜貫通型MMP以外にも、有用な新規膜貫通型MMPが存在するとの推測の基に鋭意検討を行い、新規な真のMT5-MMPを見いだし、該ポリペプチドを認識する抗体を取得することにより本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下(1)～(20)に関する。

- (1) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。
- (2) 上記(1)記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは

数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。

(3) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。

(4) 上記(3)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。

(5) 配列番号5記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。

(6) 上記(5)記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。

(7) 配列番号6記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。

(8) 上記(7)記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。

(9) 上記(1)から(8)のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

(10) 免疫学的検出法が、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法、放射性物質標識免疫抗体法、免疫組織化学染色法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、酵素免疫測定法およびサンドイッチELISA法から選ばれる免疫学的検出法である、上記(9)記載の免疫学的検出法。

(11) 上記(1)から(8)のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドの免疫学的定量法。

(12) 免疫学的定量法が、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法、放射性物質標識免疫抗体法、免疫組織化学染色法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、酵素免疫測定法およびサンドイッチELISA法から選ばれる免疫学的検出法である、上記(11)記載の免疫学的定量法。

(13) 上記(1)から(4)のいずれかに記載の抗体を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、

動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

(14) 上記(1)から(4)のいずれかに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、上記(1)から(4)のいずれかに記載の抗体を用いて該ポリペプチド量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドの発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(15) 上記(1)から(4)のいずれかに記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、上記(1)から(4)のいずれかに記載の抗体が該ポリペプチドに結合できる量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法。

(16) 上記(14)または(15)記載の方法で得られた化合物を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

(17) 上記(5)から(8)のいずれかに記載の抗体を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

(18) 上記(5)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、上記(5)から(8)のいずれかに記載の抗体を用いて該ポリペプチド量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドの発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(19) 上記(5)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、上記(5)から(8)のいずれかに記載の抗体が該ポリペプチドに結合できる量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法。

(20) 上記(18)または(19)記載の方法で得られた化合物を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

図面の簡単な説明

図1は、抗マウスMT4-MMP(2)モノクローナル抗体の反応特異性を示した図である。ELISA法により大腸菌発現マウスMT4-MMP(2)ヘモベキシン凝血酵素様ドメイン〔図中マウスMT4-MMP(2)〕、大腸菌発現ヒトMT1-MMPヘモベキシン凝血酵素様ドメイン(図中ヒトMT1-MMP)及び大腸菌体蛋白質に対するKM2560～KM2565の反応特異性を調べた。

図2は、抗マウスMT4-MMP(2)モノクローナル抗体の反応特異性を示した図である。ウエスタンブロッティングにより大腸菌発現マウスMT4-MMP(2)ヘモベキシン凝血酵素様ドメイン(図中マウスMT4-MMP)、大腸菌発現ヒトMT1-MMPヘモベキシン凝血酵素様ドメイン(図中ヒトMT1-MMP)及び大腸菌体蛋白質に対するKM2560～KM2565及びウサギポリクローナル抗体(IgG画分)の反応特異性を調べた。

図3は、ヒトMT4-MMP(2)を発現したCOS-1細胞の免疫染色による検出を示した図である。免疫染色法により、ヒトMT4-MMP(2)遺伝子導入COS-1細胞に対する抗マウスMT4-MMP(2)モノクローナル抗体(KM2561、KM2562)の反応性を調べた。ネガティブコントロール細胞として無処置COS-1細胞及びネガティブコントロール抗体としてKM1764(ラットIgG2a)を用いた。

図4は、蛍光抗体法によるヒトMT4-MMP(2)の検出を示した図である。蛍光抗体法により、ヒトMT4-MMP(2)遺伝子導入COS-1細胞に対する抗マウスMT4-MMP(2)モノクローナル抗体(KM2561、KM2562)の反応性を調べた。ネガティブコントロール細胞として無処置COS-1細胞及びネガティブコントロール抗体としてKM1764(ラットIgG2a)を用いた。縦軸は細胞数、横軸(FL1-H)は蛍光強度、また点線はコントロール(KM1764添加)、実線はモノクローナル抗体(KM2561、KM2562)反応時のパターンを示す。

図5は、ウエスタンブロッティングによるヒトMT4-MMP(2)の検出を示した図である。100 µg/レーンのサンプル(細胞可溶化液)をSDS-PAGE(7.5%アクリルアミド)に処し、抗マウスMT4-MMP(2)モノクローナル抗体KM2561を用いウエスタンブロッティングを行った。細胞(いずれもATCCから購入)はU937〔ヒト細網肉腫(human histiocytic lymphoma)〕、THP-1〔ヒト単球(human monocyte)〕、Jurkat〔ヒト急性T細胞白血病(human acute T cell leukemia)〕を用いた。

図6は、ヒトMT5-MMPとマウスMT5-MMPのアミノ酸配列とヒトMT1-MMP、MT2-MMP、MT3-MMPならびにヒトMT4-MMP(2)のアミノ酸配列を比較した図である。

*の部分は一文字表記で示す。

・の部分は一文字表記で示す。

(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)

ここで、kbはキロ塩基対(kilobase pairs)を表す。

図7は抗ヒトMT5-MMPポリクローナル抗体の反応特異性を示した図である。ELISA法により、免疫原である化合物1、2及び4に対するlot1及びlot2の反応性を調べた。コントロールとして免疫原とは別の化合物3、5を用いた。

図8は抗ヒトMT5-MMPモノクローナル抗体の反応特異性を示した図である。

ELISA 法により、免疫原である化合物 5 に対する KM2645～KM2655 の反応性及び免疫原である化合物 3 に対する KM2656～KM2661 の反応性を調べた。一次抗体を添加せずに反応させた場合をコントロールとした。コントロール化合物として、KM2645～KM2655 の場合は化合物 5 を、KM2656～KM2661 の場合は化合物 3 を用いた。

図 9 はウエスタンブロッティングによるヒト MT5-MMP の検出結果を示した図である。COS-1 細胞可溶化液（図中 COS-1）、ヒト MT4-MMP (2) 遺伝子導入 COS-1 細胞可溶化液（図中 MT4-MMP/COS-1）及びヒト MT5-MMP 遺伝子導入 COS-1 細胞可溶化液（図中 MT5-MMP/COS-1）を SDS-PAGE（7.5% アクリルアミド）に処した。抗ヒト MT5-MMP モノクローナル抗体 KM2655、KM2658、コントロールとして抗 FLAG モノクローナル抗体、抗 MT4-MMP モノクローナル抗体 KM2561、マウス IgG1、ラット IgG1 を用いウエスタンブロッティングを行った。

図 10 は蛍光抗体法によるヒト MT5-MMP の検出結果を示した図である。蛍光抗体法により、ヒト MT5-MMP 遺伝子導入 COS-1 細胞（図中 MT5-MMP/COS-1）及び無処置 COS-1 細胞に対する抗ヒト MT5-MMP モノクローナル抗体（化合物 3 より得られた KM2648 及び KM2652）の反応性を調べた。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。コントロール抗体として抗 FLAG モノクローナル抗体及び MT5-MMP に反応しないモノクローナル抗体（抗 G-CSF 誘導体モノクローナル抗体 KM511）を用いた。

図 11 は蛍光抗体法によるヒト MT5-MMP の検出結果を示した図である。蛍光抗体法により、ヒト MT5-MMP 遺伝子導入 COS-1 細胞（図中 MT5-MMP/COS-1）及び無処置 COS-1 細胞に対する抗ヒト MT5-MMP モノクローナル抗体（化合物 3 より得られた KM2653、KM2654 及び KM2655）の反応性を調べた。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

図12は蛍光抗体法によるヒトMT5-MMPの検出結果を示した図である。蛍光抗体法により、ヒトMT5-MMP遺伝子導入COS-1細胞（図中MT5-MMP/COS-1）及び無処置COS-1細胞に対する抗ヒトMT5-MMPモノクローナル抗体（化合物5より得られたKM2658）の反応性を調べた。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。コントロール抗体として、MT5-MMPに反応しないモノクローナル抗体（抗G-CSF誘導体モノクローナル抗体KM511）を用いた。

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

[1] 新規マトリックスメタロプロテアーゼMT4-MMP (2) 及びMT5-MMP (以下、別に明示しない限り、本発明のポリペプチドという) をコードするDNAの取得

(1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNAあるいはmRNAを調製する。

全RNAを調製する方法として、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学 9, 1937 (1991)] 等を用いることができる。

全RNAからポリ (A) ⁺RNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); 以下、モレキュラー クローニング 第2版と略す) やオリゴdTラテックスを用いる方法 [細胞光学 別冊8「新細胞光学実験プロトコール」秀潤社48-52頁、Nucleic Acids Res., Symposium Series, 19, 61(1988)] 等を用いることができる。

ファースト・トラック・mRNA単離キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA精製キット [Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] 等のキットを用いて組織や細胞から直接mRNAを調製することもできる。

MT 4-MMP (2) の場合には、適切な細胞または組織として、データベースから見出されたMT 4-MMPをコードするDNAのEST等が含まれていたcDNAライブラリーの種類を調べ、該ライブラリーを構築するために用いた細胞または組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

また、MT 5-MMPの場合には、適切な細胞または組織として、脳や腎臓などの組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

得られた全RNAあるいはmRNAを用い、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

cDNAライブラリー作製法として、モレキュラー クローニング 第2版やCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下カレント プロトコールズ イン モレキュラー バイオロジーと略す)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースク립ト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング[SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製] やザップー cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等をあげることができる。

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]等をあげることができる。

宿主微生物としては、大腸菌 Escherichia coli に属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XLI-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLRTM Strain (ストラタジーン社製)、Escherichia coli LE392 (モレキュラー クローニング 第2版) 等を用いることができる。

上記方法により作製した cDNA ライブラリーに加え、市販の cDNA ライブラリーも利用することができる。

市販の cDNA ライブラリーとして、クローンテック社、ライフテックオリエンタル社等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器 cDNA ライブラリーをあげることができる。

(2) 本発明のポリペプチドをコードする DNA の取得

上記 (1) で作製した cDNA ライブラリーより、本発明の DNA を有する cDNA クローンを、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブラーク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー クローニング 第2版] 等により選択することができる。

プローブとしては、MT4-MMP (2) の場合には、一部明らかになっている MT4-MMP をコードする DNA の塩基配列に基いたオリゴヌクレオチドを利用することができる。また、MT5-MMP の場合には、MT3-MMP をコードする DNA の塩基配列に基いたオリゴヌクレオチドを利用することができる。

上記方法により得られた、目的とするクローンより、上述の方法で mRNA を取得し、cDNA を合成する。

該 cDNA の両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーで PCR を行う 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) および 3'-RACE [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85,

8998 (1988)) により、プライマーに用いた配列よりも 5' 端側および 3' 端側の cDNA 断片を得ることができる。

得られた cDNA 断片をつなぎあわせることにより全長の cDNA を取得することができる。

上記の方法により取得された DNA の塩基配列は、該 DNA 断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいはパーキン・エルマー社 (Perkin Elmer : 373A・DNA シークエンサー)、ファルマシア社、ライコア (LI-COR) 社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

本発明のポリペプチドをコードするゲノム遺伝子の塩基配列を決定するためには、通常の染色体 DNA クローン化法を用いることができる (モレキュラー クローニング 第 2 版)。

即ち、本発明のポリペプチドを発現している細胞、すなわち、MT4-MMP (2) の場合には、例えばモノサイト系の THP-1 細胞等、MT5-MMP の場合には、例えば脳や腎臓等、の染色体 DNA を制限酵素で消化し、該切断断片を通常のプラスミドベクターまたはファージベクターを用いてクローニングし、ゲノムライブラリーを作製する。

上記において取得され、塩基配列の決定された DNA 断片をプローブとして用い、上記の cDNA クローニングで用いた方法と同様の方法で該ゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のポリペプチドをコードするゲノム遺伝子を有するクローンを取得することができる。

該クローンを用いて、上述の方法によりゲノム遺伝子の塩基配列を決定することができる。

また、上記方法で取得した DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒト由来の目的とする DNA を取得することができる。

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA 合成機で化学合成することにより目的とする DNA を調製することもできる。DNA 合成機としては、

チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミ
ダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 3.92等
をあげることができる。

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用
いて、GenBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索すること
により確認することができる。新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換し
たのちFASTA、フレームサーチ(FrameSearch)などの相同性検索プログラムを用
いて、GenPept、PIR、Swiss-Protなどのアミノ酸配列データベースを検索するこ
とにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

該方法により確認された新規な塩基配列を有するMT4-MMP(2)をコー
ドするDNAとして、例えば、配列番号3または配列番号4で表される配列を有
するDNA等をあげることができる。

配列番号3で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしては
pmMT4/pBSSKを、配列番号4で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミ
ドとしてはphMT4/pBSⅡKSをあげることができる。

プラスミドpmMT4/pBSSKを含有する大腸菌 Escherichia coli pmMT4/pBSSKは、
FERM BP-6528として、プラスミドphMT4/pBSⅡKSを含有する大腸菌
Escherichia coli phMT4/pBSⅡKSは、FERM BP-6530として平成10
年9月25日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市
東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)に寄託されている。

また、上記方法により確認された新規な塩基配列を有する本発明のポリペプチ
ドをコードするDNAとして、例えば、配列番号7または配列番号8で表される
配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号7で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしては
pmMT5/pBSSKを、配列番号8で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミ
ドとしてはphMT5/pGEMをあげることができる。

プラスミドpmMT5/pBSSKを含有する大腸菌 Escherichia coli pmMT5/pBSSKは、
FERM BP-6529として、プラスミドphMT5/pGEMを含有する大腸菌
Escherichia coli phMT5/pGEMは、FERM BP-6531として平成10年9

月25日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）に寄託されている。

[2] マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドの調製

(1) 形質転換体の作製

上記[1]に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下本発明のDNAという）を宿主細胞中で発現させるためには、モレキュラー クローニング 第2版やカレント プロトコールズ イン モレキュラー バイオロジー等に記載された方法を用いることができる。

即ち、該DNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換えベクターを作成し、それを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、目的とする遺伝子が発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なものは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のポリペプチド遺伝子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pKK233-2（ファルマシア社製）、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1〔プロメガ(Promega)社製〕、pQE-8〔キアゲン(QIAGEN)社製〕、pKYP10（特開昭 58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社製）、pGEX（ファルマシア社製）、pET-3（ノバジエン社製）等をあげることができる。

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trp プロモーター（Ptrp）、lac プロモータ

一、PL プロモーター、PR プロモーター、T7 プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01 プロモーター、SP02 プロモーター、penP プロモーター等をあげることができる。また P_{trp} を2つ直列させたプロモーター (P_{trp}×2)、tac プロモーター、lacT7 プロモーター、let 1 プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、シャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6～18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972))、プロトプラスト法 (特開昭 63-248394)、エレクトロポレーション法 (Gene, 17, 107 (1982), Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)) 等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスボロン属、シワニオミセス属、ピヒア等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983)]等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE107 [特開平 3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (特開平 2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp (インビトロジェン社製)、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE103 [Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987)]等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、HEK293 細胞 (ATCC: CRL-1573)、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭 63-299) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987), Virology, 52, 456 (1973)] 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、カレント・プロトコルズ 1 ~ 38, Bio Technology, 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual (1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー クローニング 第

2 版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

(2) 形質転換体の培養

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中p

Hは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーミンジェン(Pharmlngen)社製〕、Sf-900 II SFM培地(ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRHバイオサイエンス(JRH Biosciences)社製〕、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

(3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させた本発明のポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、Q-セファロース、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞上に発現された場合には、培養細胞の膜面

分を界面活性化剤で溶解して可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

また、本発明のポリペプチドは、Fmoc 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc 法（*t*-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスド・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

[3] 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

(1) 抗原用部分ペプチドの調製

本発明のポリペプチドをコードする cDNA を含む発現ベクターを上記 [2] に記載の方法により大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入してリコンビナント蛋白質を得る。ヒト MT 5-MMP 蛋白質の場合には、ヒト腫瘍培養細胞等から精製することもできる。また、ヒト MT 4-MMP (2) あるいはヒト MT 5-MMP 蛋白質の部分配列を有するペプチドをペプチド合成により得る。

抗原用部分ペプチドとしては、5~30 残基程度の蛋白質部分配列が選択される。変性していない天然の構造を有している状態の蛋白質を認識する抗体を取得するためには、立体構造上蛋白質の表面に存在している部分配列を抗原ペプチドとして選択する必要がある。立体構造上蛋白質表面に存在する部分は、Kyte と Doolittle の方法 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 157, 105-132 (1982)] などにより、親水性の高い部分配列を予測することで推測することができる。

即ち、一般的に親水性の低い部分は立体構造上蛋白質の内部に存在する場合が多く、親水性の高い部分は蛋白質表面に存在する場合が多い。また、蛋白質の N 末端、C 末端は蛋白質表面に存在する場合が多い。しかしながら、このように選択した部分ペプチドが目的通りの抗体を作製するための抗原となるとは限らない。

部分ペプチドには蛋白質と架橋するために、システインを末端に付加する。蛋

白質の内部配列を選択した場合には、必要に応じペプチドの N 末端はアセチル化、C 末端はアミド化する。

部分ペプチドは一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる〔ザ・ペプタイズ、アナリシス、シンセシス、バイオロジー、第 1 巻 (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1)、エアハルト・グロス (Erhard Gross) およびヨハン・マインホフアー (Johannes Meinhofer) 編、アカデミック・プレス (Academic Press)、1979 年、第 2 巻 1980 年、第 3 巻 1981 年；ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善、1985 年；続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店、1991 年；インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプタイド・アンド・プロテイン・リサーチ (International Journal of Peptide Protein Research)、35, 161 (1990)〕。

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、アプライド・バイオシステム社製 (Applied Biosystems, Inc., USA、以後 ABI 社と略称する) ペプチド合成機、アドバンスド・ケムテック社製 (Advanced ChemTech Inc., USA、以後 ACT 社と略称する) ペプチド合成機等の市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護した N^α-Fmoc-アミノ酸あるいは N^α-Boc-アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。

部分ペプチドの原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI 社、島津製作所、国産化学 (株)、ノバ・バイオケム社 (Nova Biochem)、渡辺化学 (株)、ACT 社、またはペプチド研究所 (株) アナスベック社 (Ana Spec) 等から入手することができる。また、部分ペプチドの原料となる保護アミノ酸、保護有機酸、保護有機アミンは報告されている合成法に従って、あるいはそれに準じて合成することができる〔ザ・ペプタイズ、アナリシス、シンセシス、バイオロジー、第 1 巻 (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1)、エアハルト・グロス (Erhard Gross) およびヨハン・マインホフアー (Johannes Meinhofer) 編、アカデミック・プレス (Academic Press)、1979 年、第 2 巻 1980 年、第 3 巻 1981 年；ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善、1985 年；続医薬品の開発、第 14

巻、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店、1991年；インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプタイド・アンド・プロテイン・リサーチ（International Journal of Peptide Protein Research）、35, 161（1990）]。

なお、該部分ペプチドの理化学的性質は以下の機器により測定できる。

質量分析は日本電子社製 JMS-HX110Aを用いFAB法により測定する。

アミノ酸分析は Bidlingmeyer, B.A. 等[ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー（Journal of Chromatography）、336 巻、93 頁（1984年）]の方法を用いる。加水分解は塩酸蒸気中 110℃で 22 時間行う。加水分解物のアミノ酸組成は Waters Accq Tag アミノ酸分析計で分析する。

（2）ポリクローナル抗体の調製

上記〔2〕あるいは〔3〕（1）に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドの全長、部分ペプチド精製標品、または上記〔3〕（1）に記載の方法により取得した部分ペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3～20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法（ELISA法）：医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press（1988）〕等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、該血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)], またはDEAEセファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(3) モノクローナル抗体の調製

(3-1) 抗体産生細胞の調製

上記(2)において、免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したラット、マウス、ハムスター等を抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラット、マウス、ハムスター等に抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(3-2) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978), Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)], SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)], P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)], P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地(RPMI-1640培地にグルタミン(1.5mmol/L)、2-メルカプトエタノール(5×10^{-5} M)、ゲンタマイシン(1.0 μ g/mL)および牛胎児血清(FCS)(CSL社製、10%)を加えた培地(以下、正常培地という)に、

さらに8-アザグアニン ($15 \mu\text{g}/\text{mL}$) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(3-3)ハイブリドーマの作製

(3-1)で取得した抗体産生細胞と(3-2)で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム 1.83 g 、リン酸一カリウム 0.21 g 、食塩 7.65 g 、蒸留水 1 リットル、 $\text{pH} 7.2$) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞 = $5 \sim 10 : 1$ になるよう混合し、 $1,200 \text{ rpm}$ で5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、 37°C で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2 g 、MEM 2 mL およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 mL を混合した溶液を $0.2 \sim 1 \text{ mL}$ 添加し、更に1~2分間毎にMEM培地 $1 \sim 2 \text{ mL}$ を数回添加する。

添加後、MEM培地を加えて全量が 50 mL になるように調製する。

該調製液を 900 rpm で5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地 [正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} mol/L)、チミジン ($1.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) およびアミノプテリン ($4 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$) を加えた培地] 100 mL 中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに $100 \mu\text{L}/\text{穴}$ ずつ分注し、 $5\% \text{ CO}_2$ インキュベーター中、 37°C で7~14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 14 (1988)] 等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品

を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(3-4)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す〔1回目は、HT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(3-4)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（Pristane）0.5 mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(3-3)で取得した本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000 rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。また、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株の培養上清中からも同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のクラスおよびサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキット等を用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280 nmでの吸光度より算出する。

なお、抗体のクラスとは抗体のアイソタイプのことでヒトでは、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE があげられる。サブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。

があげられる。

[4] 本発明の抗体の利用

(1) 本発明の抗体を用いた、本発明のポリペプチドの免疫学的検出および定量

本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを以下の方法により免疫学的に検出および定量することができる。

該方法として、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法 (ELISA)、放射性物質標識免疫抗体法 (RIA)、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法 (ABC法、CSA法等)、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチ ELISA 法 [単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック、1987年)、続生化学実験講座 5 免疫生化学研究法 (東京化学同人、1986年)] 等をあげることができる。

蛍光抗体法とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

免疫酵素抗体法 (ELISA) とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法 (RIA) とは、分離した細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンタなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、分離した細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明

の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

(2) 本発明の抗体を用いた本発明のポリペプチドの発現を調節する化合物（以下、発現調節化合物と略す）の探索および同定

本発明のポリペプチドを発現する細胞を被験試料と接触させた後、本発明のポリペプチドを認識する抗体を用いることにより、その細胞中、細胞培養上清中に存在する本発明のポリペプチドの発現調節化合物を探索、同定することができる。

細胞としては、本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチド mRNA を発現している細胞、細胞株、組織、または、下記に記載した抗体により免疫学的に検出する方法を用いて該ポリペプチドの発現が認められた、細胞、細胞株あるいは組織ならいかなるものでも用いることができる。

該ポリペプチド mRNA は、通常のノーザンハイブリダイゼーション法、RNA のドットプロットハイブリダイゼーション法、RT-PCR 法などを用いて検出する。

ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよび RT-PCR 法等に用いることのできるプライマーとして、MT 4-MMP (2) の場合には、本発明の MT 4-MMP (2) 遺伝子断片をあげることができ、具体的には配列番号 3 または配列番号 4 記載の DNA 配列から選ばれる配列を有する DNA 断片を好適に用いることができる。好適な細胞株として例えば、ヒト単球株 THP-1 (ATCC TIB-202) をあげることができる。

一方、MT 5-MMP の場合には、ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよび RT-PCR 法等に用いることのできるプライマーとして、本発明の MT 5-MMP 遺伝子断片をあげることができ、具体的には配列番号 7 または配列番号 8 記載の DNA 配列から選ばれる配列を有する DNA 断片を好適に用いることができる。好適な細胞株として例えば、ヒト線維芽細胞腫株 (HT-1080)、神経芽細胞腫 (SK-N-SH)、未分化型グリオーマ (no. 10)、グリオーマ (KALS-1)、膵臓癌 (PANC-1, MIA PaCa-2)、肝癌 (SK-HEP-1, Hep 3B) をあげ

ることができる。

本発明のポリペプチドを発現する細胞を、例えば該細胞が増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現したポリペプチド含量を、上記〔3〕記載の抗体を用い、下記の方法に準じて定量する。

免疫染色を行う細胞を免疫細胞染色用緩衝液（1% BSA、0.02% EDTA、0.05% アジ化ナトリウムを含むPBS）等に懸濁し、 $1 \sim 20 \times 10^5$ 個ずつ丸底96穴プレートに分注する。

該プレートに、〔3〕で取得した本発明のポリペプチドに対するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清、〔3〕で取得した本発明のポリペプチドに対する精製モノクローナル抗体、もしくは該モノクローナル抗体を公知の方法（酵素抗体法：学際企画刊1985年）でビオチン標識した抗体を $0.1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように免疫細胞染色用緩衝液あるいは10%動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて希釈したものを $20 \sim 500 \mu\text{L}/\text{穴}$ となるように分注し、氷冷下で30分間放置する。

上記において、〔3〕で取得した本発明のポリペプチドに対するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清または〔3〕で取得した本発明のポリペプチドに対する精製モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を洗浄後、FITCあるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識した抗イムノグロブリン抗体を $0.1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液を $50 \sim 500 \mu\text{L}/\text{穴}$ ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。ビオチン標識した該モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートにFITCあるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識したストレプトアビジンを $50 \sim 500 \mu\text{L}/\text{穴}$ ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。両ケースとも、放置後、プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を良く洗浄し、蛍光顕微鏡、セルソーター等により解析する。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物（例え

ばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等)の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。

被験試料としてペプチドを用いる場合、ランダムペプチドライブラリーを利用することができる。ランダムペプチドライブラリーとしては、ファージ上のペプチドシステム (peptides on phage) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6378 (1990); PCT 特許出願番号 96/40189]、プラスミド上のペプチドシステム (peptides on plasmids) (米国出願特許番号 5,270,170;米国出願特許番号 5,338,665)があげられる。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチド含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

(3) 本発明のポリペプチドの阻害薬または活性化薬の探索および同定

上記〔2〕に記載の方法で調製した本発明の精製ポリペプチドをコーティングしたプレートに被験試料を添加した後、該プレートに上記〔3〕に記載の方法で調製した本発明の抗体を添加する。

該抗体の本発明のポリペプチドへの結合に対する被験試料の影響を ELISA 法や RIA 法などで比較することにより、被験試料の中から本発明のポリペプチドに結合する物質をスクリーニングすることができる。

該スクリーニングにより得られる化合物には、プロテアーゼの活性を阻害する化合物(阻害薬)、および、プロテアーゼの活性を増強する活性を有する化合物(活性化薬)が含まれる。

被験試料としては、上記(2)であげたものを用いることができる。

(4) 本発明の抗体を用い、健常者および被験者の細胞または組織に存在する本発明のポリペプチドを上記(1)記載の方法により免疫学的に検出または定量し、その量を健常者と被験者とで比較し、発現量の変化を調べることにより、MT4-MMP (2) に対する抗体の場合には、被験者の変形性関節症、慢性関節リウ

マチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、虚血性心疾患、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの病態の診断に用いることができる。また、MT 5-MMPに対する抗体の場合には、被験者の変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、虚血性心疾患、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの病態の診断に用いることができる。

(5) 本発明のポリペプチドの機能（プロテアーゼ活性）を阻害する抗体を投与することにより、MT 4-MMP (2) に対する抗体の場合には、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症の治療または予防が期待される。また、MT 5-MMPに対する抗体の場合には、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症の治療または予防が期待される。

本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として該抗体単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として用いることが望ましい。

該治療薬の投与方法としては、治療に際し最も効果的な方法を使用することが望ましく、経口投与または、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与による方法を用いることができる。

該治療薬の剤形としては、軟膏剤、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、テープ剤等をあげることができる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、

顆粒剤等をあげることができる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造することができる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用い製造することができる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、例えば、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製することができる。

座剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製することができる。

噴霧剤は、本発明の抗体をそのまま噴霧剤として用いることが可能であるが、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製した噴霧剤が好ましい。

担体として、具体的には乳糖、グリセリン等を例示することができる。

本発明の抗体および担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤を調製することが可能である。

これらの非経口剤においても、経口剤で添加剤として例示した成分を添加することができる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

[5] 発現調節化合物の利用

上記〔４〕（２）で取得される発現調節化合物は、MT 4-MMP（２）に対する抗体を用いて得られる化合物の場合には、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症の治療または予防などが期待される。また、MT 5-MMPに対する抗体を用いて得られる化合物の場合には、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症の治療または予防などが期待される。

該発現調節化合物を含有する医薬は、上記〔４〕の本発明の抗体の医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて医薬製剤として調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔４〕の場合と同様の方法で投与することができる。

実 施 例

以下により具体的な実施例をあげて説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例 1 マウスMT 4-MMP関連蛋白〔MT 4-MMP（２）〕遺伝子のクローニング

MT 4-MMP遺伝子はヒトの脳で高発現していることから、マウス１７日胚の脳cDNAライブラリーをZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene)を用い、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

ヒトMT 4-MMP遺伝子の部分配列(配列番号１７の２３３－１８９９)をプローブとして用い、上記cDNAライブラリーのスクリーニングをブランクハイブリダイゼーション法により行った。

該スクリーニングにより上記プローブとハイブリダイズする陽性クローンの数種について塩基配列を解析した。解析したクローンは全て報告されたヒトMT 4-MMP遺伝子において欠落していると思われるシグナルペプチド配列部分を含

んでおり、最長のクローンは3.5 kbであった。従って、マウスでは587アミノ酸の配列番号1に記載したMT4-MMP(2)を発現できる配列番号3に記載したDNAに対応するmRNAが発現していると考えられた。

実施例2 ヒトMT4-MMP(2)遺伝子のクローニング

ヒトMT4-MMP遺伝子に関するESTクローンをデータベースで調べたが、上記マウスで見られたようなシグナルペプチドをコードする部分を含むクローンの登録はなかった。従って、ヒトMT4-MMP遺伝子において分泌型のヒトMT4-MMP遺伝子は存在しないか、あるいは単離するには困難な理由があると思われた。

実施例1で取得したマウスMT4-MMP(2)遺伝子のシグナルペプチドに相当するN末の部分をコードする配列をプローブとしてヒト脳cDNAライブラリー(クロンテック社製)をスクリーニングしたが、相当する遺伝子の単離はできなかった。そこで5'RACE法にて転写産物の5'領域の解析を行った。細胞はMT4-MMP mRNAの発現が確認された単核球由来のTHP-1(ATCC TIB-202, American Type Culture Collection)細胞を用いた。

即ち、ヒトTHP-1細胞から単離したpoly(A)+RNAとヒトMT4-MMP選択的なプライマー(配列番号9)を使用してsuperscript II(ギブコBRL社製)でcDNAを作成した。得られたcDNAに単一鎖のオリゴヌクレオチドアダプター(配列番号10)をT4RNAリガーゼでつなぎ、MT4-MMP選択的なプライマー(配列番号9)とアダプター選択的なプライマー(配列番号11)でGC緩衝液とLA Taq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCR後、遺伝子選択的な他のプライマー(配列番号12)とアダプター選択的なプライマー(配列番号13)を用いてPCRを行った。

50個のクローンを解析した結果、3個はMT4-MMPの配列を含むcDNA断片であったが、47個はマウスMT4-MMP(2)に類似するシグナルペプチド配列をコードするcDNA断片であった。このことにより、既に明らかになっているプロペプチド配列の下流部分に加えて、シグナルペプチドを含む配列番号2に示すヒトMT4-MMP(2)をコードする配列番号4に示すmRNA

の全量域が明らかとなった。ESTクローンのH97792クローンの遺伝子配列はPuenteにより報告されたMT4-MMP [Cancer Research, 56, 944 (1996)]とほとんど同一であったが、catalytic domainの配列の一部が異なっており、ESTクローンH97792の方がマウスMT4-MMP(2)との保存性が高かった。全配列を新たに決定したところ、Puenteにより報告されたMT4-MMP [Cancer Research, 56, 944 (1996)]の既に明らかになっている部分においても、MT4-MMP(2)は配列の異なる部分が見られた。

マウスおよびヒトMT4-MMP(2)は相互によく保存されており、プロペプチド、触媒、ヒンジ、ヘモベキシン凝血酵素様ドメインの各ドメインはそれぞれ87、87、78、96%のホモロジーを有していた。シグナルペプチドと膜貫通部位比較的類似性が低く54と35%であった。また、触媒ドメインのヒトMT4-MMP(2)とMT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMPの間との比較は、それぞれ、36、39、31%であった。このことから、マウスMT4-MMP(2)はヒトMT4-MMP(2)に最も近く、ヒトMT4-MMP(2)のマウスホモログであると結論された。

実施例3 MT4-MMP(2)の発現と遺伝子産物の検出

単離したcDNAから確かに遺伝子産物が翻訳されることを確認するために、cDNAをSV40プロモーターを持つpSG5ベクター(ストラタジーン社製)に組み込んだ。発現した産物の検出のために、潜在型酵素のプロセッシング部位の下流にFLAG配列(イーストマンケミカル社製)を組み込むことにより、抗FLAG抗体による検出を可能とした。

COS-1細胞にマウスおよびヒトのMT4-MMP(2)の発現プラスミドをトランスフェクションし、48時間後に採取した細胞を溶解して、ウエスタン法によってFLAG標識MT4-MMP(2)の検出を行った。抗FLAG抗体M2(イーストマンケミカル社製)によってともに、発現プラスミドをトランスフェクションした細胞に特異的な66kDaのバンドが検出された。

実施例4 MT4-MMPの転写産物の検出および解析

MT 4-MMP転写産物は5' 端に Alu 配列を持つことから、イントロンを含んでいる可能性があったため、ヒトMT 4-MMP (2) 遺伝子の部分配列(配列番号4の212-519)をプローブとして用い、ヒューマンサイエンス研究資源バンクのライブラリー (Deposit >No. LI020) よりハイブリダイゼーション法により、ハイブリダイズするクローンを単離して、該クローンよりプラスミドを常法により抽出し、該プラスミドに含有されるMT 4-MMPの5' 末端付近の塩基配列(配列番号17の140~272番)の周辺の遺伝子配列を調べた。

MT 4-MMPとMT 4-MMP (2) 遺伝子を比較した時に、相同性が無くなる領域のMT 4-MMP遺伝子配列(配列番号17の1~139番)はゲノム配列(配列番号18)の3008~3147番にほぼ一致し、その境界にはスプライシングドナー配列が存在した。MT 4-MMPのエクソンコードする配列(配列番号17の140~340番)はゲノムの配列(配列番号18)の3148~3280番及び配列番号18の3564~3633番にほぼ一致した。以上の結果から、第一イントロンを残した転写産物がMT 4-MMPであると結論された。

以上の結果から、ヒトではMT 4-MMPとMT 4-MMP (2) の2種類の mRNAが発現していると考えられた。

これら2種類の転写産物をそれぞれ RT-PCR によって識別するために、それぞれに特異的な5' 領域のプライマー (MT 4-MMP : 配列番号14, MT 4-MMP (2) : 配列番号15) と共通の3' プライマー (配列番号16) を作成した。

これら転写産物の各種癌細胞における発現を表1に示した。

表1 MT4-MMP(2)およびMT4-MMPの
転写産物の癌細胞での発現

癌細胞株	MT4-MMP(2)	MT4-MMP	寄託番号
Jurkat (T cell)	++	+/-	ATCC TIB-152
Raji(B cell)	-	-	ATCC CCL-86
BJAB(B cell)	-	-	ATCC HB-136
THP-1(monocytic)	++	+	ATCC TIB-202
K562(monocytic)	++	-	ATCC CCL-243
U-937(monocytic)	++	-	ATCC CRL-1593.2
U-251 MG(astrocytoma)	++	-	発酵研 IF050288
SK-N-SH(neuroblastoma)	++	-	ATCC HTB-11
no.10(glioma)	+/-	-	発酵研 IF050368
KALS-1(glioma)	++	-	発酵研 IF050434
MKN-7(gastric)	+	-	理化研 RCB0999
MKN-28(gastric)	-	-	理化研 RCB1000
NUGC-4(gastric)	+	-	HS財団 JCRB0834
PANC-1(pancreatic)	++	+	ATCC CRL-1469
MIA PaCa-2(pancreatic)	++	+/-	ATCC CRL-1420
SK-HEP-1(hepatoma)	++	+	ATCC HTB-52
Hep 3B(hepatoma)	++	+	ATCC HB-8064
ZR-75-1(breast)	++	+	ATCC CRL-1500
MCF7(adenocarcinoma)	++	+	ATCC HTB-22
T-24(bladder)	++	+	ATCC HTB-4
A375(melanoma)	++	+	ATCC CRL-1619
HT-1080(fibrosarcoma)	+	-	ATCC CCL-121

++:強発現、+:中程度の発現、+/-:少量発現、-:発現無し

ATCC: American Type Culture Collection

HS 財団: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

理化研: 特殊法人理化学研究所

発酵研: 財団法人発酵研究所

MT4-MMPはMT4-MMP(2)の発現が認められる細胞でだけ発現していた。

以上の結果から、MT4-MMP(2)が主たる転写産物であるが、細胞によっては類似した転写制御下にMT4-MMPの発現が起こっていると考えられる。

実施例5 マウス組織におけるMT4-MMP(2)の発現

4週齢のマウスの組織を臓器ごとに切除してRNAを抽出してMT4-MMP(2)の発現パターンを調べた。20 μ gの全RNAを1%アガロースゲルで泳

動しナイロンメンブレンに転写して ^{32}P で標識したマウスMT4-MMP(2)遺伝子をプローブに用いてノーザンブロッティングを行い、MT4-MMP(2)の発現パターンを調べた。

特に発現の高い臓器は脳、小脳、脳幹、大腸、子宮、睪丸であった。副腎、乳腺、胎盤ではほとんど発現は認められなかった。マウスでの発現結果はPuenteらによるヒト組織での報告[Cancer Research, 56, 944 (1996)]と一致した。

マウスの各臓器でのMT4-MMP(2)の発現は脳で非常に高く、他に大腸、子宮、睪丸など限定された組織での発現が見られ、MT1-MMP、MT2-MMPが比較的広範な組織での発現を示すのに対して特徴的であった。このことから、MT4-MMP(2)が発現臓器に特異的な細胞外基質の分解を介して、組織の恒常性維持に関与していると考えられる。

実施例6 マウスMT4-MMP(2)部分ペプチド(ヘモベキシン凝血酵素様ドメイン)の大腸菌での発現

配列番号1の321～550番目に示されるアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基の付加した配列を有するマウスMT4-MMP(2)部分ペプチド(ヘモベキシン凝血酵素様ドメイン)をコードするcDNAを、マウスMT4-MMP(2)のcDNAを鋳型として用いポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法で増幅した。

得られた増幅断片を大腸菌の発現ベクターであるpET3a(宝酒造社製)にサブクローニングして、さらに大腸菌株BL21(DE3)pLysS(宝酒造社製)に導入した。該大腸菌を100 $\mu\text{g/mL}$ のアンピシリン存在下、1Lの発現用培地で OD_{600} が0.5になるまで培養して、0.4 mmol/Lのイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)で刺激後さらに3時間培養した。

培養後、常法に基づいて大腸菌内に形成されたマウスMT4-MMP(2)部分ペプチドよりなる不溶体(inclusion body)を取得し、8 mmol/L尿素、50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.6)および20 mmol/Lジチオスレイトール(DTT)を含む可溶化液に溶解した。該溶解液をHigh Q anion exchange columnにアプライし、0.2 mol/L塩化ナトリウム溶出フラクションを回収した。

該フラクションを、50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.6)、6 mmol/L尿素、1 mmol/Lジ

チオスレイトール、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、100 mmol/L 塩化亜鉛、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液で希釈し、該希釈液にシタミン（最終濃度 20 mmol/L）を加えた。次いで、50 mmol/L Tris-HCl(pH8.6)、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、100 mmol/L 塩化亜鉛、5 mmol/L β メルカプトエタノール、1 mmol/L 2-ヒドロキシエチルジスルフィド、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液を用い、4℃で透析した。さらに、10 倍量の 50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5)、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、50 mmol/L 塩化亜鉛、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液で透析した(4時間×3回)。この溶液を 22000 $\times g$ 、4℃、10 分間遠心分離し、沈殿を除いた。

得られた上清を 50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、150 mmol/L 塩化ナトリウム、10 mmol/L 塩化カルシウムおよび 0.02% アジ化ナトリウムを含む緩衝液で平衡化した S-200 カラムクロマトグラフィーに通塔し、ゲルろ過を行い、ヘモベキシン凝血酵素様ドメインに相当するマウス MT4-MMP (2) 部分ペプチドを取得した。取得した該部分ペプチドを抗体作製のための抗原として用いた。

実施例 7 マウス MT4-MMP (2) を認識するポリクローナル抗体の作製

実施例 6 で調製したマウス MT4-MMP (2) 部分ペプチド 100 μg を完全フロインドアジュバントとともにウサギ（日本白色ウサギ）2羽に投与した。投与 2 週間後より、マウス MT4-MMP (2) 部分ペプチド 100 μg を不完全フロインドアジュバントとともに 1 週間に 1 回、計 6 回投与した。

耳微静脈より部分採血し、その血清抗体価を下記実施例 8 (2) に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したウサギから全採血により血清を採取した。得られた血清は下記実施例 8 (5) に示す方法により IgG 画分にまで精製し、ポリクローナル抗体として用いた。

実施例 8 マウス MT4-MMP (2) を認識するモノクローナル抗体の作製

(1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例 6 で調製したマウス MT4-MMP (2) 部分ペプチド 50 μg を水酸化アルミニウムアジュバント [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory, p99, 1988) 2 mgおよび百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1×10^9 細胞とともに5週令雌SDラットに投与した。

投与2週間後より、マウスMT4-MMP (2) 部分ペプチド50 μ gを1週間に1回、計4回投与した。該ラットの眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

脾臓をMEM (Minimum Essential Medium) 培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (250 xg, 5分) した。得られた沈殿画分に、トリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.6) を添加し、1~2分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分 (細胞画分) をMEM培地で3回洗浄し、細胞融合に用いた。

(2) 酵素免疫測定法

アッセイ用の抗原には実施例6で得られたマウスMT4-MMP (2) 部分ペプチドを用いた。またコントロール抗原として実施例6と同様に調製された大腸菌発現ヒトMT1-MMPヘモベキシン凝血酵素様ドメイン (以下ヒトMT1-MMPと略記す。) および大腸菌体蛋白質を用いた。

各々の抗原をELISA用96穴プレートにそれぞれ10 μ g/mL、50 μ L /穴ずつ分注し、4度で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1% 牛血清アルブミン (BSA) /ダルベッコリン酸バッファー (Phosphate buffered saline : PBS) を100 μ L /穴加え、室温で1時間放置し、残っている活性基をブロックした。

放置後、1% BSA/PBSを捨て、該プレートに被免疫ラット抗血清、抗マウスMT4-MMP (2) モノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を100 μ L /穴分注し、2時間放置した。該プレートを0.05% ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート [(ICI社商標Tween 20相当品 : 和光純薬社製)] /PBS (以下Tween-PBSと表記) で洗浄後、200倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン (ダコ社製) を50 μ L /穴加えて室温、1時間放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 [2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム、1mmol/L ABTS/

0.1mol/Lクエン酸バッファー (pH4.2)) を添加し、発色させOD415 nmの吸光度をプレートリーダー (Emax ; Molecular Devices社) を用いて測定した。

(3) マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3X63Ag8U.1 (P3-U1 : ATCCより購入) を正常培地で培養し、細胞融合時に 2×10^7 個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

(4) ハイブリドーマの作製

上記(1)で得られたラット脾細胞と上記(3)で得られた骨髄腫細胞とを10 : 1になるよう混合し、遠心分離 (250 xg, 5分) した。得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2 g、MEM培地 2 mLおよびジメチルスルホキシド0.7 mLの混液を 10^6 個のラット脾細胞あたり0.2~1 mL加え、該懸濁液に1~2分間毎にMEM培地1~2 mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50 mLになるようにした。

該懸濁液を遠心分離 (900 rpm, 5分) し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞を、メスピペットによる吸込み吸出しでゆるやかにHAT培地 [10%ウシ胎児血清添加RPMI培地にHAT Media Supplement (ベーリンガーマンハイム社製) を加えた培地] 100 mL中に懸濁した。該懸濁液を96穴培養用プレートに200 μ L/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で10~14日間培養した。

培養後、培養上清を上記(2)に記載した酵素免疫測定法で調べ、マウスMT4-MMP (2) 部分ペプチドに反応してヒトMT1-MMPおよび大腸菌由来蛋白に反応しない穴を選び、そこに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを2回繰り返して、抗マウスMT4-MMP (2) モノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM2560、KM2561、KM2562、KM2563、KM2564及び2565を得た (工業技術院生命工学工業技術研究所にそれぞれ平成11年5月27日に寄託番号KM2560: FERM BP-6730、KM2561: FERM BP-6731、KM2562: FERM BP-6732

として寄託されている) (図1)。

(5) モノクローナル抗体の精製

ブリスタン処理した8週令ヌード雌マウス (BALB/c) に上記 (4) で得られたハイブリドーマ株を $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹それぞれ腹腔内注射した。10～21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取 (1～8 mL/匹) した。

該腹水を遠心分離 (1200 xg, 5分) し固形分を除去した。精製IgMモノクローナル抗体は、該腹水を50%硫酸アンモニウムを用いて塩析し、塩化ナトリウム0.5 mol/Lを添加したPBSで透析後、セルロファイブGSL2000 (生化学工業社製) (ベットボリューム750 mL) のカラムに流速15 mL/時で通塔しIgM画分を集めることにより取得した。

精製IgGモノクローナル抗体は、カプリル酸沈殿法 [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] により精製することにより取得した。抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いたELISA法により決定した。結果を表2に示す。

表2 抗マウスMT4-MMP (2) モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ KM2560～2565の抗体クラス。

KM No.	抗体クラス
KM2560	IgM
KM2561	IgG2a
KM2562	IgG2a
KM2563	IgM
KM2564	IgM
KM2565	IgM

(6) ウェスタンブロッティング

上記 (4) で選択された抗マウスMT4-MMP (2) モノクローナル抗体の反応特異性をウェスタンブロッティングにより検討した。

実施例6で得られたマウスMT4-MMP (2) 部分ペプチド0.1 μ g/レーン、ヒ

トMT1-MMP 0.4 μg /レーンあるいは大腸菌由来蛋白0.1 μg /レーンをSDS-ポリ
リアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE: 5-20%グラジエントゲル、アトー社製)
[Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]
を用いて分画後、PVDF膜 (ミリポア社製) にブロッティングした。

該膜を1% BSA-PBSでブロッキング後、該膜に抗マウスMT4-MMP (2) モノ
クローナル抗体の培養上清及び実施例7で取得されたウサギポリクローナル抗体
を添加し、室温で2時間放置した。該膜をTween-PBSでよく洗浄した後、第二抗
体として1000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン
抗体 [ダコ社製] を添加し、室温で1時間放置した。ポリクローナル抗体の場合
は1% BSA/PBSで20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、モノクローナル抗体と同様に用いた。
第二抗体としてペルオキシダーゼ標識ブタ抗ウサギイムノグロブリン抗体 [ダコ
社製] を1000倍希釈して用いた。

該膜をTween-PBSでよく洗浄した後、ECL kit (アマシャムファルマシアバイ
オテック社製) を用いて検出し、抗マウスMT4-MMP (2) モノクローナル抗体
KM2560~2565及びウサギポリクローナル抗体が、マウスMT4-MMP (2) 部分
ペプチドの分子量に相当する26Kダルトンのバンドに特異的に反応することを確認
した (図2)。

実施例9 COS-1細胞株へのヒトMT4-MMP (2) 遺伝子の遺伝子導入

遺伝子導入宿主細胞として、ATCC から購入したサル腎臓由来細胞であるCO
S-1細胞(ATCC CRL-1650)を用いた。10 cm 培養シャーレに 2×10^5 cells/mL
に調整した培養COS-1細胞を10 mL加え、一晚培養を行った後、FuGENE™6
トランスフェクション試薬 (ベーリンガーマンハイム社製) を用いて、以下の方
法にて遺伝子導入を行った。

まず、ヒトMT4-MMP (2) 遺伝子の全長cDNAを発現ベクターであるpSG5
Vector [ストラタジーン (STRATAGENE) 社製] にサブクローニング後、大腸
菌株XL-1 Blue MRF' に導入した。該大腸菌を100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリン存在下、
150 mLのLB(Luria-Bertani)培地で培養を行い、NucleoBond Plasmid Kit [ク
ローンテック (CLONTECH) 社製] のAX500カートリッジを用い、プラスミド

DNA を精製した。

プラスチックチューブに無血清培地 OPTI-MEM[®] I (ライフテックオリエンタル社製) を 816 μ L 加え、FuGENE を 24 μ L 添加し、室温にて 5 分間静置した。該静置溶液に、Tris-EDTA (pH 8.0) で 1 μ g/ μ L に希釈した上記ヒト MT4-MMP (2) のプラスミド DNA 溶液 12 μ L を添加し、穏やかに混ぜた後、15 分間静置した。このプラスミド溶液 852 μ L を前日から培養した COS-1 細胞株培養液に添加し、培養液を均一にした後、3 日間培養を行った。

実施例 10 COS-1 細胞におけるヒト MT4-MMP (2) 発現の免疫染色による検出

上記方法に従い遺伝子導入した COS-1 細胞の培養上清を除去し、PBS を加えてセルスクレイパー (住友ベークライト社製) を用いて細胞をシャーレより回収し、 2×10^5 個/mL となるように PBS を用いて細胞浮遊液を調整した。500 μ L の細胞浮遊液をシランコート済みのスライドガラス [マツナミ社製] に、サイトスピン 3 [シャンドン (SHANDON) 社製] を用い、40 xg で 3 分間遠心分離することで接着させた。

4% パラフォルムアルデヒド (paraformaldehyde) (和光純薬社製) を用い、4℃ で 15 分間固定を行った後、PBS にて 3 分間の洗浄を 3 回行った (以下、該洗浄工程を '洗浄' と略す)。非特異的反応を除去する為、ブロッキング試薬 (ダコ社製) を 100 μ L 添加し、室温にて 1 時間インキュベートした。ブロッキング試薬を除き、一次抗体として、マウス MT4-MMP (2) に対するハイブリドーマの培養上清 (KM2561、KM2562) またはコントロール抗体を産生するハイブリドーマの培養上清 (KM1764、ラット IgG2a) を 100 μ L 添加し、室温にて一晩インキュベートした後、洗浄を行い、6 μ g/mL に希釈したビオチン標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (ダコ社製、0.25% 正常ウサギ血清含有) を 100 μ L 添加し、室温にて一時間反応させた。

洗浄後、内在性ペルオキシダーゼを不活化させる為、0.3% 過酸化水素水 / 0.1 mol/L アジ化ナトリウムを用い室温で 30 分間インキュベートを行った。洗浄後、使用 30 分前に調整しておいたアビジンビオチン複合体 [ベクター (VECTOR)

社製] を 100 μ L 添加し、室温で 30 分間反応させた。洗浄後、ジアミノベンジジン [Diaminobenzidine (ベクター社製)] を用い、マウス MT4-MMP (2) の発現を検出した。対比染色としてヘマトキシリン染色を行い、観察を行った。なお、ネガティブコントロールとして MT4-MMP (2) プラスミド DNA を添加せず同様の処理を行った無処置 COS-1 細胞を用いた。図 3 に示したように、ヒト MT4-MMP (2) 遺伝子導入を行った COS-1 細胞において、KM2561 及び KM2562 に特異的な反応が認められた。

実施例 1 1 蛍光抗体法によるヒト MT4-MMP (2) の検出

上記方法に従い遺伝子導入した COS-1 細胞及び無処置 COS-1 細胞の培養上清を除去し、PBS を加えてセルスクレイパー (住友ベークライト社製) を用いて細胞をシャーレより回収し、 1×10^6 個/mL となるように PBS を用いて細胞浮遊液を調整した。その液 1 mL をプラスチックチューブに入れ、遠心分離後、上清を吸引除去した。細胞の固定には FIX & PERM Cell Permeabilization Kits [カルタグ (Caltag) 社製] を用いた。固定した細胞に抗 MT4-MMP (2) 抗体 (KM2561、KM2562 培養上清) 50 μ L を添加し、攪拌後 4 $^{\circ}$ C で 1 時間反応した。

PBS を用いて遠心洗浄後、100 倍希釈したビオチン標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン抗体 (ダコ社製) 50 μ L を加え 4 $^{\circ}$ C で 1 時間反応した。PBS を用いて遠心洗浄後、200 倍希釈したストレプトアビジン-FITC [Streptavidine-Fluorescein isothiocyanate conjugate、ファーマーミンゲン (Pharmingen) 社製] 50 μ L を加え 4 $^{\circ}$ C 30 分反応した。PBS を用いて遠心洗浄後、FACSscan [ベクトンディッキンソン (Becton Dickinson) 社製] で測定した。図 4 に示したように KM2561、KM2562 により、遺伝子導入 COS-1 細胞で発現されたヒト MT4-MMP (2) が検出された。縦軸は細胞数、横軸 (FL1-H) は蛍光強度、また点線はコントロール (MT4-MMP (2) を認識するモノクローナル抗体のかわりに MT4-MMP (2) を認識しない KM1764 を添加)、実線は抗マウス MT4-MMP (2) モノクローナル抗体 KM2561 または KM2562 添加時のパターンを示す。

実施例 1 2 ウェスタンブロッティングによるヒト MT4-MMP (2) の検出

下記細胞株を遠心分離して細胞を回収した後、上清除去後、細胞ペレットに可溶化液〔50 mmol/L HEPES、250 mmol/L塩化ナトリウム、1% NP40、1mmol/L DTT、1 mmol/Lフェニルメチルスルフォニルフルオリド (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)、5 µg/mLロイペプチン (Leupeptin)] を添加し、良く混和した後、4℃で10分間静置した。7000 x g、30分間遠心分離し、上清を回収し、サンプルとして使用した。

タンパク定量試薬〔Protein assay、バイオラド (Bio-Rad) 社製〕により蛋白定量後、100 µg/レーンのサンプルをSDS-PAGE (7.5%アクリルアミド) に処し、前述〔実施例 8 (6)〕の方法で、抗マウスMT4-MMP (2) モノクローナル抗体 KM2561を用いウェスタンブロッティングを行った。細胞株 (いずれもATCCから購入) はU937〔ヒト細網肉腫 (human histiocytic lymphoma)〕、THP-1〔ヒト単球 (human monocyte)〕、Jurkat〔ヒト急性T細胞白血病 (human acute T cell leukemia)〕を用いた。図5に示したようにいずれの細胞でも68キロダルトン (kd) マーカー付近にヒトMT4-MMP (2) が検出された。

実施例 1 3 マウスMT 3-MMP 遺伝子のクローニング

マウスMT 3-MMP 遺伝子を単離するために、マウス17日胚の脳 cDNAライブラリーをZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene)を用い、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

ヒトMT 3-MMP 遺伝子をプローブとして上記cDNAライブラリーのスクリーニングをブランクハイブリダイゼーション法により行った。強いシグナルと弱いシグナルを示すブランクが得られたため、それらのクローンの塩基配列を決定した。

弱いシグナルを示すクローンを解析した結果、その中の一つの2.1 kbの配列はヒトならびにラットMT 3-MMPと弱い相同性を示すが、他のMMPとも相同性が大幅に異なることから、新規のMMP遺伝子であると考えられた。

続いて、上記ライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法により2.1 kbの配列とハイブリダイズする3.7 kbのcDNAを取得した。2.1 kb

bと3.7 kbの配列から、配列番号7に示す4.2 kbのcDNA配列が得られた。

配列番号7に示すcDNAには配列番号5で表される618アミノ酸の蛋白質がコードされていた。配列番号5のペプチドはMT-MMPの各ドメインに相当する配列をよく保存された状態で持っていることから、新規のMT-MMP、即ち、マウスMT5-MMPであると結論された(図6)。

実施例14 ヒトMT5-MMP遺伝子のクローニング

マウスMT5-MMPに対応するヒト遺伝子を確認する為に、マウスMT5-MMP遺伝子をプローブとしてヒト腎臓cDNAライブラリー(クロンテック社製)のスクリーニングを上記実施例13と同様の方法でブラークハイブリダイゼーションを行い、マウスMT5-MMPと92%の相同性を有し、既知のMT-MMPとは異なる遺伝子を得た。

解析したヒトMT5-MMPのcDNAクローンは全て、シグナルペプチドをコードするはずの5'領域を欠いていたため、以下に示す5' RACE法によって欠損部分の配列を決定し、ヒトMT5-MMPをコードする全領域を含む遺伝子配列を決定した。

cDNAをsuperscript II (ギブコBRL)を使用して、ヒト脳のpoly(A)+ RNA(クロンテック社製)とヒトMT5-MMP選択的なプライマー(配列番号19)を用いて、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

得られたcDNAに単一鎖のオリゴヌクレオチドアダプター(配列番号10)をT4RNAリガーゼでつなぎ、MT5-MMP選択的なプライマー(配列番号19)とアダプター選択的なプライマー(配列番号11)でGC緩衝液とLA Taq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。

PCR後、遺伝子選択的な他のプライマー(配列番号20)とアダプター選択的なプライマー(配列番号13)を用いてPCRを行った。マウス遺伝子をプローブとしてヒト腎臓cDNAライブラリーから得られた配列と5' RACE法によって得られた配列から、配列番号6の645アミノ酸の蛋白質をコードする配列番号8の2.6 kbのcDNAが取得できた。

実施例 15 MT5-MMPのmRNAの臓器での発現

組織におけるMT5-MMP遺伝子発現をノーザン・ブロットイングで調べた。

即ち、20 μ gの全RNAを1%アガロースゲルで泳動しナイロンメンブレンに転写し、 32 Pで標識したマウスMT5-MMP遺伝子をプローブに用いてノーザンブロットイングを行い、約4 kbのMT5-MMPのmRNAの発現パターンを調べた。

2週齢のマウスでは、発現は脳にのみ強いシグナルが観察され、他の臓器の組織では脳に比べて検出限界かそれ以下の低い発現しか認められなかった。

ヒトの組織での発現をヒトMT5-MMP遺伝子をプローブに用いて multiple tissue blot (クロンテック社製) を行って調べたところ、脳に高発現であった。 32 Pで標識したヒトMT5-MMP遺伝子をプローブに用いてノーザンブロットイングを行い、ヒト脳でも4.0 kbと4.8 kbのMT5-MMPのmRNAの強い発現が認められた。ヒトではそれ以外に腎臓と脾臓で発現が認められた。脳では4.8 kbのmRNAが、腎臓と脾臓では4.0 kbのmRNAが強く発現していた。

MT5-MMP特異的なプライマー（配列番号21および22）を用いた、RT-PCRによる解析では腎臓、脾臓ともに脳と同じサイズのDNA断片が同程度の効率で増幅し、サイズの異なるプロダクトが見られないことから、短い転写産物も完全なコーディング領域を持つと考えられる。

MT5-MMPの発現をマウス及びヒトで調べると特徴的な発現が脳に見られた。特にマウスで見る限り、発現は脳に局限しており、他の臓器での発現は非常に低かった。

脳の発現に特徴があることから、脳の組織別プロット (human brain multiple tissue blot: クロンテック社製) を用い、部位特異的発現を調べた。

MT5-MMPの発現は小脳に高い発現が見られる他、大脳皮質、髄質、後頭部、前頭部、側頭部、被殻での発現が認められたが、脊髄での発現は見られなかった。

この結果は、他のMT-MMPが様々な組織で発現するのとは異なる、MT5

—MMP特有の際だった特徴を示している。

ヒトでも、脳の発現は強く、それ以外にも腎臓及び脾臓での発現が見られた。ヒト脳の部位特異的な発現を調べると、小脳での高発現が特徴的であった。小脳での高発現はマウスでも確認された。

この結果は、MT5-MMPは脳組織の形成と維持、神経回路構築などの過程に伴う細胞周辺の細胞外基質分解を制御している可能性を示している。

実施例 16 MT5-MMPのmRNAの癌細胞での発現

MT1-MMPは多くの癌組織で、癌細胞自身及び周辺の間質細胞で高頻度に発現しており、ゼラチナーゼAの組織レベルでの活性化因子として働いている。様々な癌細胞株における発現をMT5-MMP特異的なプライマー（配列番号21および22）を用いて、RT-PCRで調べた。

結果を表3に示した。

表 3 MT 5 - MMP 転写産物の癌細胞での発現

癌細胞株	MT5-MMP	寄託番号
Jurkat (T cell)	-	ATCC TIB-152
Raji (B cell)	-	ATCC CCL-86
BJAB (B cell)	-	ATCC HB-136
THP-1(monocytic)	-	ATCC TIB-202
K562(monocytic)	-	ATCC CCL-243
U-937(monocytic)	-	ATCC CRL-1593.2
U-251 MG(astrocytoma)	-	発酵研 IF050288
SK-N-SH(neuroblastoma)	+++	ATCC HTB-11
no. 10(glioma)	++	発酵研 IF050368
KALS-1(glioma)	+++	発酵研 IF050434
MKN-7(gastric)	+	理化研 RCB0999
MKN-28(gastric)	-	理化研 RCB1000
NUGC-4(gastric)	+	HS財団 JCRB0834
PANC-1(pancreatic)	+	ATCC CRL-1469
MIA PaCa-2(pancreatic)	+	ATCC CRL-1420
SK-HEP-1(hepatoma)	+	ATCC HTB-52
Hep 3B(hepatoma)	+	ATCC HB-8064
ZR-75-1(breast)	?	ATCC CRL-1500
MCF7(adenocarcinoma)	-	ATCC HTB-22
T-24(bladder)	-	ATCC HTB-4
A375(melanoma)	+/-	ATCC CRL-1619
HT-1080(fibrosarcoma)	+/-	ATCC CCL-121

+++ : 非常に強発現、++ : 強発現、+ : 中程度の発現、+/- : 少量発現、- : 発現無し

ATCC : American Type Culture Collection

HS 財団 : 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

理化研 : 特殊法人理化学研究所

発酵研 : 財団法人発酵研究所

MT 1 - MMP が様々な癌細胞株で発現しているのに対して、MT 5 - MMP の発現細胞は限られていたが、脳での発現に一致して神経系由来の神経芽細胞腫 [SK-N-SH (HTB-11, ATCC)]、未分化型グリオーマ [no. 10 (IF050368, 発酵研究所)]、グリオーマ [KALS-1 (IF050434, 発酵研究所)] で高い発現が見られた。

また、膵臓癌 [PANC-1 (CRL-1469, ATCC) , MIA PaCa-2 (CRL-1420, ATCC)]、肝癌 [SK-HEP-1 (HTB-52, ATCC) , Hep 3B (HB-8064, ATCC)] での発現が特徴的であった。

MT - MMP の細胞表面での異常発現は細胞の浸潤性を亢進させることが考え

られる。実際にMT 1-MMPの過剰発現は癌細胞株の浸潤能を亢進させ、実験的転移を高発させる。ヒト癌組織では癌細胞や周辺の線維芽細胞がMT 1-MMPを高頻度で発現しており、MT 1-MMPが発現場所で活性化させるゼラチナーゼAの存在は癌の浸潤・転移とよく相関する。

未分化型グリオーマ、グリオーマ、膵臓癌、肝がんの細胞株で発現が見られることから、特定のタイプの癌ではMT 5-MMPの過剰発現が癌細胞の悪性性質に関与している可能性が示唆された。

実施例 17 MT 5-MMPを認識するポリクローナル抗体の作成

大腸菌で発現させたMT 5-MMP部分ペプチド、具体的には下記実施例 19で合成された配列番号 23～27に示されるMT 5-MMP部分ペプチド（化合物 1～5）100 μ gを完全フロイドアジュバントとともにウサギ（Japanese White Rabbit）2羽に投与する。

投与2週間後より、MT 5-MMP部分ペプチド100 μ gを不完全フロイドアジュバントとともに1週間に1回、計6回投与する。

耳微静脈より部分採血し、その血清抗体価を下記実施例 18（2）に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したウサギから全採血により血清を採取する。

得られた血清は下記実施例 18（5）に示す方法によりIgG画分にまで精製し、ポリクローナル抗体として用いる。

実施例 18 MT 5-MMPを認識するモノクローナル抗体の作成

（1）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

大腸菌で発現させたMT 5-MMP部分ペプチド、具体的には下記実施例 19で合成された配列番号 23～27に示されるMT 5-MMP部分ペプチド（化合物 1～5）50 μ gをアルミニウムゲル2mgおよび百日咳ワクチン（千葉県血清研究所製） 1×10^9 細胞とともに5週令雌ラット（SD）に投与する。

投与2週間後より、MT 5-MMP部分ペプチド50 μ gを1週間に1回、計4回投与する。

該ラットの眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫3日後に脾臓を摘出する。

脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離（1,200 rpm, 5分）する。

得られた沈殿画分にトリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH 7.65）を添加し、1～2分間処理することにより赤血球を除去する。

得られた沈殿画分（細胞）をMEM培地で3回洗浄し、細胞融合に用いる。

（2）酵素免疫測定法

アッセイ用の抗原には上記MT5-MMP部分ペプチドを用いる。またコントロール抗原としてヒトMT1-MMPヘモベキシン凝血酵素様ドメイン（以下ヒトMT1-MMPと略記す。）を用いる。

各々の抗原をELISA用96穴プレートにそれぞれ10 µg/mL、50 µL/穴ずつ分注し、4℃で一晩放置して吸着させる。

該プレートを洗浄後、1%BSA-PBSを100 µL/穴加え、室温で1時間放置し、残っている活性基をブロックする。

放置後、1%BSA-PBSを捨て、該プレートに被免疫ラット抗血清、抗MT5-MMPモノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を50 µL/穴分注し、2時間放置する。

該プレートをTween-PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン（ダコ社製）を50 µL/穴加えて室温、1時間放置する。

該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を添加し、発色させOD415 nmの吸光度をプレートリーダー（Emax; Molecular Devices 社）を用いて測定する。

（3）マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株P3-U1を正常培地で培養し、細胞融合時に 2×10^7 以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供する。

(4) ハイブリドーマの作製

上記(1)で得られたラット脾細胞と(3)で得られた骨髓腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離(1,200 rpm, 5分)する。

得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングライコール-1,000 (PEG-1,000) 2g、MEM培地2 mLおよびジメチルスルホキシド0.7 mLの混液を 10^8 ラット脾細胞あたり0.2~1 mL/加え、該懸濁液に1~2分間毎にMEM培地1~2 mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50 mLになるようにする。

該懸濁液を遠心分離(900 rpm, 5分)し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞をメスピペットによる吸込み、吸出しでゆるやかにHAT培地100 mL中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに100 μ L/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で10~14日間培養する。

培養後、培養上清を上記(2)に記載した酵素免疫測定法で調べ、MT5-MMP部分ペプチドに反応してヒトMT1-MMPに反応しない穴を選び、限界希釈法によるクローニングを2回繰り返し、抗MT5-MMPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立する。

(5) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した8週令ヌード雌マウス(Balb/c)に上記(4)で得られるハイブリドーマ株を $5\sim 20\times 10^6$ 細胞/匹それぞれ腹腔内注射する。

10~21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取(1~8 mL/匹)する。

該腹水を遠心分離(3,000 rpm, 5分)し、固形分を除去する。

精製IgMモノクローナル抗体は、50%硫酸アンモニウムを用いて塩析し、塩化ナトリウム0.5 Mを添加したPBSで透析後、セルロフアインGSL2000(生化学工業社製)(ベッドボリューム750 mL)のカラムに流速15 mL/時で通塔しIgM画分を集めることにより取得する。

精製 Ig G モノクローナル抗体は、カプリル酸沈殿法 [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] により精製することにより取得する。

抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いた ELISA 法で決定する。

(6) ウェスタンブロッティング

上記 (4) で選択された抗 MT 5-MMP モノクローナル抗体の反応特異性をウェスタンブロッティングにより検討する。

MT 5-MMP 部分ペプチドあるいはヒト MT 1-MMP を $1 \mu\text{g}/\text{レーン}$ で SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] を用いて分画後、PVDF 膜にブロッティングする。

該膜を BSA-PBS でブロッキング後、該膜に抗 MT 5-MMP モノクローナル抗体の培養上清を添加し、室温で 2 時間放置する。

該膜を PBS-Tween でよく洗浄した後、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体 [ダコ (DAKO) 社製] を添加し、室温で 1 時間放置する。

該膜を PBS-Tween でよく洗浄した後、Colour development reagent (バイオラッド社製) を用いて検出し、抗 MT 5-MMP モノクローナル抗体が、MT 5-MMP の分子量に相当するバンドに特異的に反応することを確認する。

実施例 19 ヒト MT 5-MMP 部分ペプチドの合成

ヒト MT 5-MMP 部分ペプチド (化合物 1~5) を、配列番号 6 記載のアミノ酸配列をもとに合成した。

略号

本発明において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関する IUPAC-IUB 委員会 (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature) の勧告 [ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリ

ー (European Journal of Biochemistry), 138 巻, 9 頁 (1984 年)) に従った。

以下の略号は、特に断わらない限り対応する下記のアミノ酸を表す。

Ala: L-アラニン
Asn: L-アスパラギン
Asp: L-アスパラギン酸
Arg: L-アルギニン
Cys: L-システイン
Gln: L-グルタミン
Glu: L-グルタミン酸
Gly: グリシン
His: L-ヒスチジン
Ile: L-イソロイシン
Leu: L-ロイシン
Lys: L-リジン
Met: L-メチオニン
Phe: L-フェニルアラニン
Pro: L-プロリン
Ser: L-セリン
Thr: L-スレオニン
Trp: L-トリプトファン
Tyr: L-チロシン
Val: L-バリン

以下の略号は、対応する下記のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す。

Fmoc: 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル
Ac: アセチル
tBu: t-ブチル
Boc: t-ブチルオキシカルボニル
Trt: トリチル

Pmc: 2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル

Fmoc-Thr(tBu)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-スレオニン

Fmoc-Ser(tBu)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-セリン

Fmoc-Tyr(tBu)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-チロシン

Fmoc-Lys(Boc)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^ε-t-ブチルオキシカルボニル-L-リジン

Fmoc-Glu(OtBu)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-グルタミン酸-γ-t-ブチルエステル

Fmoc-Arg(Pmc)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^ε-2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル-L-アルギニン

Fmoc-His(Trt)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^{im}-トリチル-L-ヒスチジン

Fmoc-Trp(Boc)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^{ind}-t-ブチルオキシカルボニル-L-トリプトファン

Fmoc-Asn(Trt)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^δ-トリチル-L-アスパラギン

Fmoc-Asp(OtBu)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸-β-t-ブチルエステル

Fmoc-Gln(Trt)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^γ-トリチル-L-グルタミン

Fmoc-Cys(Trt)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-S-トリチル-L-システイン

以下の略号は、対応する下記の反応溶媒、反応試薬等を表す。

HBTU: 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェイト

HOBt: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール

DMF: N,N-ジメチルホルムアミド

TFA: トリフルオロ酢酸

DIEA: ジイソプロピルエチルアミン

(1) 化合物 1 (配列番号 23) Ac-Pro-Val-Thr-Glv-Val-Leu-Asp-Gln-Thr-Thr-Ile-Glu-Trp-Met-Lvs-Lvs-Cvs-OH の合成

H-Cys(Trt)が 16.8 μ mol 結合した担体樹脂 (Cl-Trt レジン, Ana Spec 製) 30 mg を自動合成機 (島津製作所) の反応容器に入れ、1 mL の DMF を加えて 10 分間攪拌し溶液を排出し、島津製作所の合成プログラムに従い次の操作を行った。

(a) Fmoc-Lys(Boc)-OH (200 μ mol)、HBTU (200 μ mol)、HOBt 1 水和物 (200 μ mol) および DIEA (400 μ mol) を DMF (800 μ L) 中で 3 分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を 30 分間攪拌し、溶液を排出した。

(b) 担体樹脂を 900 μ L の DMF で 1 分間洗浄し、これを 5 回繰り返した。こうして、Fmoc-Lys(Boc)-Cys(Trt)を担体上に結合した。

次に以下の Fmoc 基脱保護工程を行った。

(c) 30% ピペリジン-DMF 溶液 900 μ L を加えて混合物を 4 分間攪拌し、該溶液を排出し、この操作をもう 1 回繰り返した。

(d) 担体樹脂を 600 μ L の DMF で 1 分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を 5 回繰り返した。

こうして、Fmoc 基を除去した H-Lys(Boc)-Cys(Trt)の結合した担体樹脂を得た。次に、(a) の工程で Fmoc-Lys(Boc)-OH を用いて縮合反応を行い、(b)の洗浄工程、次いで(c)、(d)の脱保護工程を経て、H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Cys(Trt)が担体上に合成された。以下、工程(a)において、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Pro-OH を順次用いて、(a)～(d)を繰り返した。

次に無水酢酸 32 μ L、DMF 900 μ L を用いて N 末端にアセチル基を導入した。

その後、DMF、メタノール及びブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下 12 時間乾燥して、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、TFA (90%)、チオアニソール (5%)、1,2-エタンジチオール (5%) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で 2 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約 10mL を加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収、減圧乾燥し、粗ペプチド 42.1mg を取得した。この粗生成物を 90%酢酸 5mL に希釈し、逆相カラム (資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mmI.D. X 25mm) を用いた HPLC で精製した。0.1% TFA 水溶液に、TFA 0.1% を含む 90% アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220nm で検出し、化合物 1 を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、化合物 1 を 3.2mg 得た。

質量分析 [FABMS] ; $m/z = 1991.7 (M+H^+)$

アミノ酸分析; Asx 1.1 (1), Glx2.1(2), Gly1.1(1), Thr 2.9(3), Pro 1.0 (1), Val 1.8(2), Met 1.1(1), Lys2.0(2), Ile1.0(1), Leu1.0(1), Cys1.1(1)

(2) 化合物 2 (配列番号 2 4) Ac-His-Glu-Ile-Lys-Ser-Asp-Arg-Lys-Glu-Ala-Asp-Ile-Met-Ile-Phe-Phe-Ala-Ser-Cys-OH の合成

H-Cys(Trt)が 16.8 μ mol 結合した担体樹脂 (Cl-Trt レジン、Ana spec 製) 30mg を出発物質とし、上記 (1) と同様にして、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH を順次縮合した後に、無水酢酸を用いて N 末端にアセチル基を導入した。洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。TFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2-エタンジチオール (2.5%) およびチオフエノール (2%) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で 8 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。以降上記 (1) と同様にして、粗ペプチド 38mg を取得し、逆相

カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 2 を 3.1mg 得た。

質量分析 [FABMS] ; $m/z = 2283.3$ ($M+H^+$)

アミノ酸分析; Asx 2.1 (2), Glx 2.2 (2), Ser 1.7(2), His 0.9(1), Arg 1.0(1), Ala 2.2 (2), Met 1.0(1), Lys 2.0(2), Ile 2.9(3), Phe 2.1(2), Cys 1.2(1)

(3) 化合物 3 (配列番号 25) Ac-Leu-Pro-Val-Arg-Arg-Ile-His-Ser-Pro-Ser-Glu-Arg-Lys-His-Glu-Arg-Gln-Cys-OH の合成

H-Cys(Trt)が 16.8 μ mol 結合した担体樹脂 (Cl-Trt レジン, Ana spec 製) 30mg を出発物質とし、上記 (1) と同様にして、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Leu-OH を順次縮合した後に、無水酢酸を用いて N 末端にアセチル基を導入した。洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。TFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2-エタンジチオール (2.5%) およびチオフェノール (2%) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で 8 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。以降上記 (1) と同様にして、粗ペプチド 49.2mg を取得し、逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 3 を 20.4mg 得た。

質量分析 [FABMS] ; $m/z = 2271.4$ ($M+H^+$)

アミノ酸分析; Glx 2.9 (3), Ser 2.0(2), His 1.9(2), Arg 4.0(4), Pro 2.2 (2), Val 1.0(1), Lys 1.1 (1), Ile 0.8(1), Leu 1.1(1), Cys 1.2(1)

(4) 化合物 4 (配列番号 26) H-Cys-Asn-Gln-Lys-Glu-Val-Glu-Arg-Arg-Lys-Glu-Arg-Arg-Leu-Pro-Gln-Asp-NH₂ の合成

Fmoc-NH が 16.5 μ mol 結合した担体樹脂 (RINK Amide MBHA レジン, Nova Biochem 製) 30mg を出発物質とし、上記 (1) と同様にして、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Leu-OH、

Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。TFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2-エタンジチオール (2.5%) およびチオフエノール (2%) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で 8 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。以降上記 (1) と同様にして、粗ペプチド 52.8mg を取得し、逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 4 を 21.3mg を得た。

質量分析 [FABMS] ; $m/z = 2183.6$ ($M+H^+$)

アミノ酸分析; Asx 1.9 (2), Glx 5.1(5), Arg 3.9(4), Pro 1.1(1), Val 1.0(1), Lys 2.0 (2), Leu 1.0 (1), Cys 0.8 (1)

(5) 化合物 5 (配列番号 27) H-Cys-Asn-Lys-Thr-Gly-Pro-Gln-Pro-Val-Thr-Tyr-Tyr-Lys-Arg-Pro-Val-Gln-Glu-Trp-Val-OH の合成

Fmoc-Val が $15.6 \mu\text{mol}$ が結合した担体樹脂 (Wang レジン、島津社製) 30mg を出発物質とし、上記 (1) と同様にして、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。TFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2-エタンジチオール (2.5%)、チオフエノール (2%) 及び 2-メチルインドール (5mg/mL) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で 6 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。以降上記 (1) と同様にして、粗ペプチド 52.8mg を取得し、逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 5 を 16.2mg 得た。

質量分析 [FABMS] ; $m/z = 2394.3$ ($M+H^+$)

アミノ酸分析; Asx 1.0 (1), Glx 3.1 (3), Gly 1.0(1), Arg 1.0(1), Thr 1.9(2),
Pro 3.1 (3), Tyr 2.0(2), Val 3.0(3), Lys 1.9 (2), Cys 1.1(1)

実施例 20 ヒト MT5-MMP を認識するポリクローナル抗体の作製

(1) 免疫原の調製

実施例 19 で得られたヒト MT5-MMP の部分ペプチドである化合物 1 ~ 5 は、免疫原性を高める目的で以下の方法で KLH (カルビオケム社) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、KLH を PBS に溶解して 10 mg / mL に調整し、1 / 10 容量の 25 mg / mL MBS [N-(m-Maleimidobenzoyloxy)succinimide; ナカライテスク社] を滴下して 30 分攪拌反応させる。あらかじめ PBS で平衡化したセファデックス G-25 カラムなどのゲルろ過カラムでフリーの MBS を除いて得られた KLH-MB 2.5 mg を 0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (PH 7.0) に溶解したペプチド 1 mg と混合し、室温で 3 時間、攪拌反応させた。反応後、PBS で透析したものを免疫原として用いた。

(2) 動物の免疫とポリクローナル抗体の作製

上記 (1) で調製した化合物 1、2 および 4 の KLH コンジュゲートを等量ずつ混合したもの 200 μ g を完全フロインドアジュバントとともにウサギ (日本白色ウサギ) 2羽に投与した。投与 2 週間後より、混合 KLH コンジュゲート (化合物 1、2、4) 200 μ g を不完全フロインドアジュバントとともに 1 週間に 1 回、計 7 回投与した。

耳微静脈より部分採血し、その血清抗体価を下記実施例 21 (2) に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したウサギから全採血により血清を採取した。得られた血清は下記実施例 21 (5) に示す方法により IgG 画分にまで精製し、ポリクローナル抗体として用いた。

得られたポリクローナル抗体の化合物 1、2、4 に対する反応性を実施例 21 (2) に示す酵素免疫測定法により調べた。その結果、図 7 に示すように、ロッ

ト 1、2 いずれについても化合物 1 と 2 について特異的な抗体価の上昇が認められた。化合物 4 については抗体価は上昇しなかった。

実施例 2 1 ヒト MT 5-MMP を認識するモノクローナル抗体の作製

(1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例 1 9 で調製した化合物 1 ~ 5 の KLH コンジュゲート 100 μ g をそれぞれ水酸化アルミニウムアジュバント [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p99, 1988] 2 mg および百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1×10^9 細胞とともに 5 週令雌 BALB/c マウス各 3 匹に投与した。投与 2 週間後より、各 KLH コンジュゲート 100 μ g を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。該マウスの眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。

脾臓を MEM (Minimum Essential Medium) 培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (250 xg, 5 分) した。得られた沈殿画分にトリス塩化アンモニウム緩衝液 (pH 7.6) を添加し、1 ~ 2 分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分 (細胞画分) を MEM 培地で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

(2) 酵素免疫測定法 (バインディング ELISA)

アッセイ用の抗原には実施例 1 9 で得られた各化合物をサイログロブリン (以下、THY と略す。) とコンジュゲートしたものを用いた。作製方法は実施例 2 0

(1) に記した通りであるが、架橋剤には MBS の代わりに SMCC [4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylic acid N-hydroxysuccinimido ester; シグマ社] を用いた。96 穴の EIA 用プレート (グライナー社) に、上記のように調製したコンジュゲートを 10 μ g/mL, 50 μ L/穴で分注し、4 度で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1% 牛血清アルブミン (BSA) /ダルベッコリン酸バッファー (Phosphate buffered saline: PBS) を 100 μ L/穴加え、室温で 1 時間放置し、残っている活性基をブロックした。

放置後、1% BSA/PBS を捨て、該プレートに被免疫マウス抗血清、抗ヒト MT

5-MMPモノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を50 μ L/穴分注し、2時間放置した。該プレートに0.05% ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート[(ICI社商標Tween 20相当品：和光純薬社製)]/PBS (以下Tween-PBSと表記) で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリンを50 μ L/穴加えて室温、1時間放置した。被免疫ウサギ抗血清もしくはIgG画分の場合には、同様に反応させた後、第二抗体として200倍希釈したペルオキシダーゼ標識ブタ抗ウサギイムノグロブリン(ダコ社製)を用いた。該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム、1mmol/L ABTS/0.1mol/Lクエン酸バッファー(pH4.2)]を添加し、発色させOD415 nmの吸光度をプレートリーダー(Emax; Molecular Devices社)を用いて測定した。

(3) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株P3X63Ag8U.1 (P3-U1: ATCCより購入)を正常培地(10%ウシ胎児血清添加RPMI培地)で培養し、細胞融合時に 2×10^7 個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

(4) ハイブリドーマの作製

上記(1)で得られたマウス脾細胞と上記(3)で得られた骨髓腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離(250 xg, 5分)した。得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37°Cで、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2 g、MEM培地 2 mLおよびジメチルスルホキシド0.7 mLの混液を 10^8 個のマウス脾細胞あたり0.5 mL加え、該懸濁液に1~2分間毎にMEM培地 1 mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50 mLになるようにした。

該懸濁液を遠心分離(900 rpm, 5分)し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞を、メスピペットによる吸込み吸出しでゆるやかにHAT培地[10%ウシ胎児血清添加RPMI培地にHAT Media Supplement(ペーリンガー・マンハイム社製)を加えた培地] 100 mL中に懸濁した。該懸濁液を96穴培養用プレートに200 μ L/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37°Cで10~

14日間培養した。

培養後、培養上清を上記(2)に記載した酵素免疫測定法で調べ、抗原ペプチドに反応してコントロールペプチドに反応しない穴を選びそこに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを2回繰り返し、抗ヒトMT5-MMPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。化合物3を抗原に用いてハイブリドーマKM2645～2655を、化合物5を抗原に用いてハイブリドーマKM2656～2661を取得した。

ハイブリドーマKM2655およびKM2658は、それぞれFERM BP-6883およびFERM BP-6884として、平成11年9月21日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されている。

図8に示すように、いずれのハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体も免疫原に用いた化合物に特異的な反応性を示した。

(5) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した8週令ヌード雌マウス(BALB/c)に上記(4)で得られたハイブリドーマ株を $5\sim 20\times 10^6$ 細胞/匹それぞれ腹腔内注射した。10～21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取(1～8 mL/匹)した。

該腹水を遠心分離(1200 xg、5分)し、固形分を除去した。

精製IgGモノクローナル抗体は、カプリル酸沈殿法[Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]により精製することにより取得した。モノクローナル抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いたELISA法により表4に示すように決定された。

表4 抗ヒトMT5-MMPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ
KM2645～2661の抗体クラス。

KM No.	抗体クラス
KM2645	G1
KM2646	G1
KM2647	G1
KM2648	G2b
KM2649	G2b
KM2650	G2b
KM2651	G1
KM2652	G2b
KM2653	G2b
KM2654	G2a
KM2655	G1
KM2656	G1
KM2657	G1
KM2658	G1
KM2659	G1
KM2660	G1
KM2661	G1

実施例22 抗ヒトMT5-MMP抗体を用いたヒトMT5-MMP蛋白質の検出

(1) COS-1細胞株へのヒトMT5-MMP遺伝子の遺伝子導入

まず、ヒトMT5-MMP遺伝子の触媒ドメインのN末にFLAGエピトープ(DYKDDDDK、配列番号28)をPCR extension 法にて挿入した。得られたヒトMT5-MMP-FLAG遺伝子を発現ベクターである pTL1 Vector [ストラタジーン (STRATAGENE) 社製 pSG5 Vector に SacI、KpnI、および SmaI 制限酵素サイトを挿入したもの] にサブクローニングして、さらに大腸菌株 XL-1 Blue MRF' に導入した。該大腸菌を 100 µg/mL のアンピシリン存在下、150 mL の LB(Luria-Bertani)培地で培養を行い、NucleoBond Plasmid Kit [クローンテック (CLONTECH) 社製] の AX500 カートリッジを用い、プラスミド DNA を精製した。

遺伝子導入宿主細胞として、ATCC から購入したサル腎臓由来細胞であるCOS-1細胞(ATCC CRL-1650)を用いた。5 cm培養シャーレに 2×10^5 cells/mLに調整した培養COS-1細胞を5 mL加え、一晚培養を行った後、FuGENETM6トランスフェクション試薬(ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて、以下の方法で遺伝子導入を行った。

プラスチックチューブに無血清培地 OPTI-MEM^R I (ライフテックオリエンタル社製)を408 μ L加え、FuGENEを12 μ L添加し、室温にて5分間静置した。別のプラスチックチューブにTris-EDTA (pH 8.0)で1 μ g/ μ Lに希釈した上記ヒトMT5-MMPのプラスミドDNA溶液6 μ Lに添加し、調整したFuGENE溶液を更に添加し、穏やかに混ぜた後、15分間静置した。このプラスミド溶液426 μ Lを前日から培養したCOS-1細胞株に添加し、培養液を均一にした後、3日間培養を行った。また、同様の方法によりヒトMT4-MMP(2)の遺伝子導入も行なった。

(2) ウェスタンブロッティングによるヒトMT5-MMP蛋白質の検出

上記(1)記載の方法に従い遺伝子導入したCOS-1細胞及び無処置COS-1細胞をピペッティングにより回収した。PBSで一回洗浄後、 1×10^7 個/mLとなるようにSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)用サンプルバッファ[0.06mol/L Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10%グリセロール, 5% 2-メルカプトエタノール]を加え、100℃で5分間加熱し、さらに超音波処理を行うことにより完全に細胞を可溶化した。

上記のように調製した細胞可溶化液を10 μ L(1×10^5 個)/レーンでSDS-PAGE(5-20%グラジエントゲル、アトー社製)〔Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988〕で分画した後、PVDF膜(ミリポア社製)にブロッティングした。

該膜を1% BSA-PBSでブロッッキング後、該膜に抗ヒトMT5-MMPモノクローナル抗体の培養上清を原液で添加し、室温で2時間放置した。該膜をTween-PBSでよく洗浄した後、第二抗体として2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン抗体〔ダコ社製〕を添加し、室温で1時間放置した。

該膜をTween-PBSでよく洗浄した後、ECL kit（アマシャムファルマシアバイオテック社製）を用いて検出した。コントロール抗体として抗マウスMT4-MM Pモノクローナル抗体KM2561および抗FLAGモノクローナル抗体（M2；EASTMAN KODAK COMPANY社）を10 μ g/mLで反応させ、同様に検出した。

図9に示す様に抗ヒトMT5-MMPモノクローナル抗体（KM2655、KM2658）はヒトMT5-MMP蛋白質の分子量に相当する66Kダルトン付近のバンドに特異的に反応した。

（３）蛍光抗体法（フローサイトメトリー）によるヒトMT5-MMPの検出

上記（１）記載の方法に従い遺伝子導入したCOS-1細胞及び無処置COS-1細胞をピペティングにより回収した。PBSで洗浄した後、細胞膜の抗体透過性を上げるため、100%メタノール（氷冷）で4℃で10分間処理した。PBSで洗浄後、10%正常ウサギ血清にて4℃で30分間ブロッキングした。1 \times 10⁵個/チューブで分注した後、遠沈して上清をぬき、抗ヒトMT5-MM Pモノクローナル抗体の培養上清を加えて4℃で30分間反応させた。PBSで洗浄後、FITC 標識抗マウスイムノグロブリン抗体（マウスイムノグロブリンに特異的なもの；和光純薬）を30倍希釈100 μ L/チューブで分注し、4℃、30分遮光反応させた。よくPBSで洗浄した後、セルアナライザー（コールター社；EPICS XLsystem II）にて解析した。コントロール抗体として抗FLAGモノクローナル抗体あるいは抗G-CSF誘導体モノクローナル抗体KM511を10 μ g/mLで反応させ、同様に検出した。

図10～図12に示したように、化合物3より得られたKM2648、KM2652～2655および化合物5より得られたKM2658はCOS-1細胞発現ヒトMT5-MMPを特異的に検出した。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

配列表フリーテキスト

配列23：MT5-MMPの部分アミノ酸配列、Xaa=N^α-アセチルプロリン

配列24：MT5-MMPの部分アミノ酸配列、Xaa=N^α-アセチルヒスチジン

配列 25 : MT5-MMPの部分アミノ酸配列、Xaa=N^α-アセチルロイシン

配列 26 : MT5-MMPの部分アミノ酸配列

配列 27 : MT5-MMPの部分アミノ酸配列

配列 28 : FLAGエピトープ

産業上の利用可能性

本発明により得られる新規ポリペプチドMT4-MMP(2)の抗体を用いることにより、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織障害、白血球の浸潤を伴う炎症等の疾患の診断、予防、治療が可能となる。

また、本発明により得られる新規ポリペプチドMT5-MMPの抗体を用いることにより、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織障害、白血球の浸潤を伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍等の疾患の診断、予防、治療が可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。
2. 請求項1記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。
3. 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。
4. 請求項3のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。
5. 配列番号5記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。
6. 請求項5記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。
7. 配列番号6記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する抗体。
8. 請求項7記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを認識する抗体。
9. 請求項1から8のいずれか1項に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。
10. 免疫学的検出法が、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法、放射性物質標識免疫抗体法、免疫組織化学染色法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、酵素免疫測定法およびサンドイッチ ELISA 法から選ばれる免疫学的検出法である、請求項9記載の免疫学的検出法。
11. 請求項1から8のいずれか1項に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫学的定量法。
12. 免疫学的定量法が、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法、放射性物質標識免疫抗体法、免疫組織化学染色法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、酵素免疫測定法およびサンドイッチ ELISA 法から選ばれる免疫学的検出法である、請求項11記載の免疫学的定量法。

13. 請求項1から4のいずれか1項に記載の抗体を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

14. 請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項1から4のいずれか1項に記載の抗体を用いて該ポリペプチド量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドの発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

15. 請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、請求項1から4のいずれか1項に記載の抗体が該ポリペプチドに結合できる量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法。

16. 請求項14または15記載の方法で得られた化合物を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

17. 請求項5から8のいずれか1項に記載の抗体を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

18. 請求項5から8のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項5から8のいずれか1項に記載の抗体を用いて該ポリペプチド量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドの発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

19. 請求項5から8のいずれか1項に記載のポリペプチドと被験試料とを接触

させ、請求項 5 から 8 のいずれか 1 項に記載の抗体が該ポリペプチドに結合できる量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法。

20. 請求項 18 または 19 記載の方法で得られた化合物を含有する、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

図 1

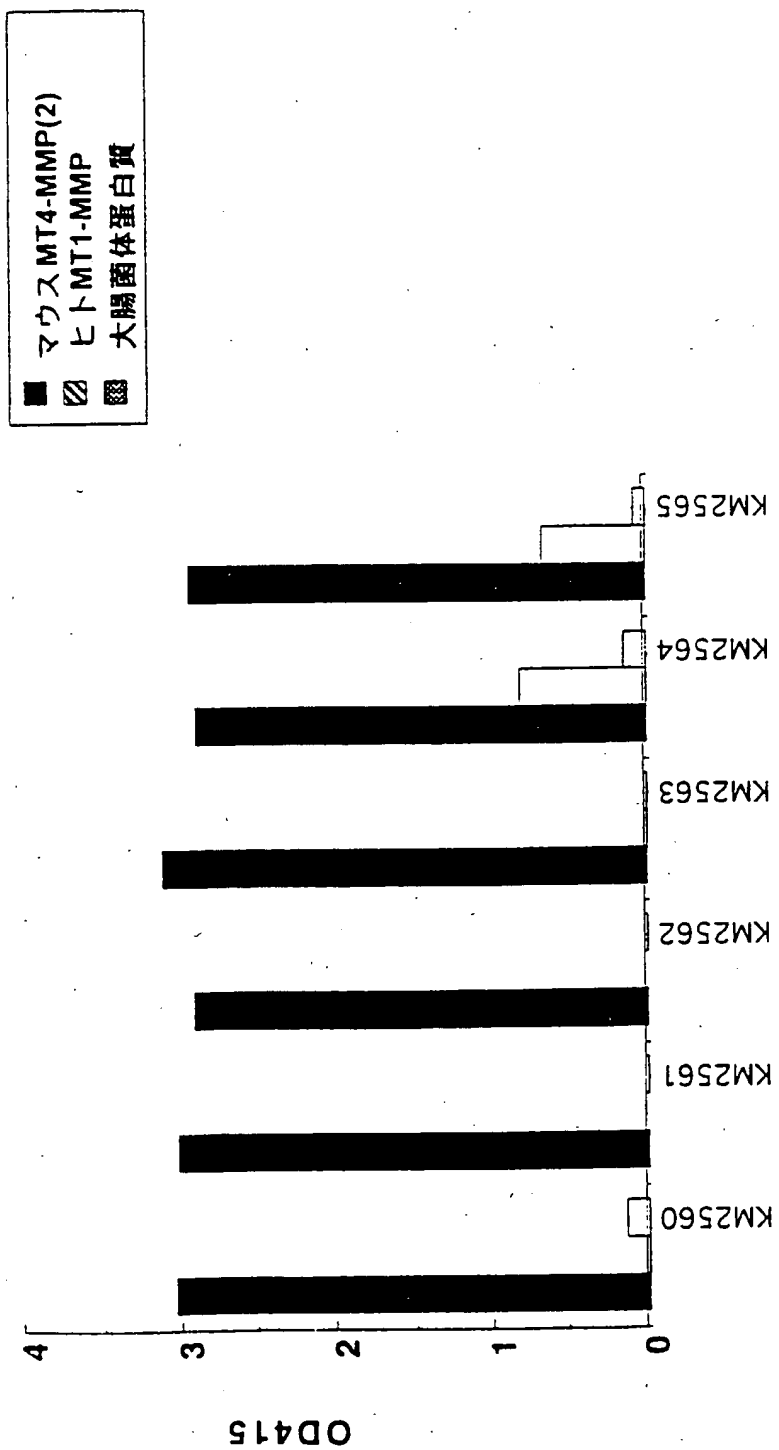


図 2

ウェスタンブロッティング

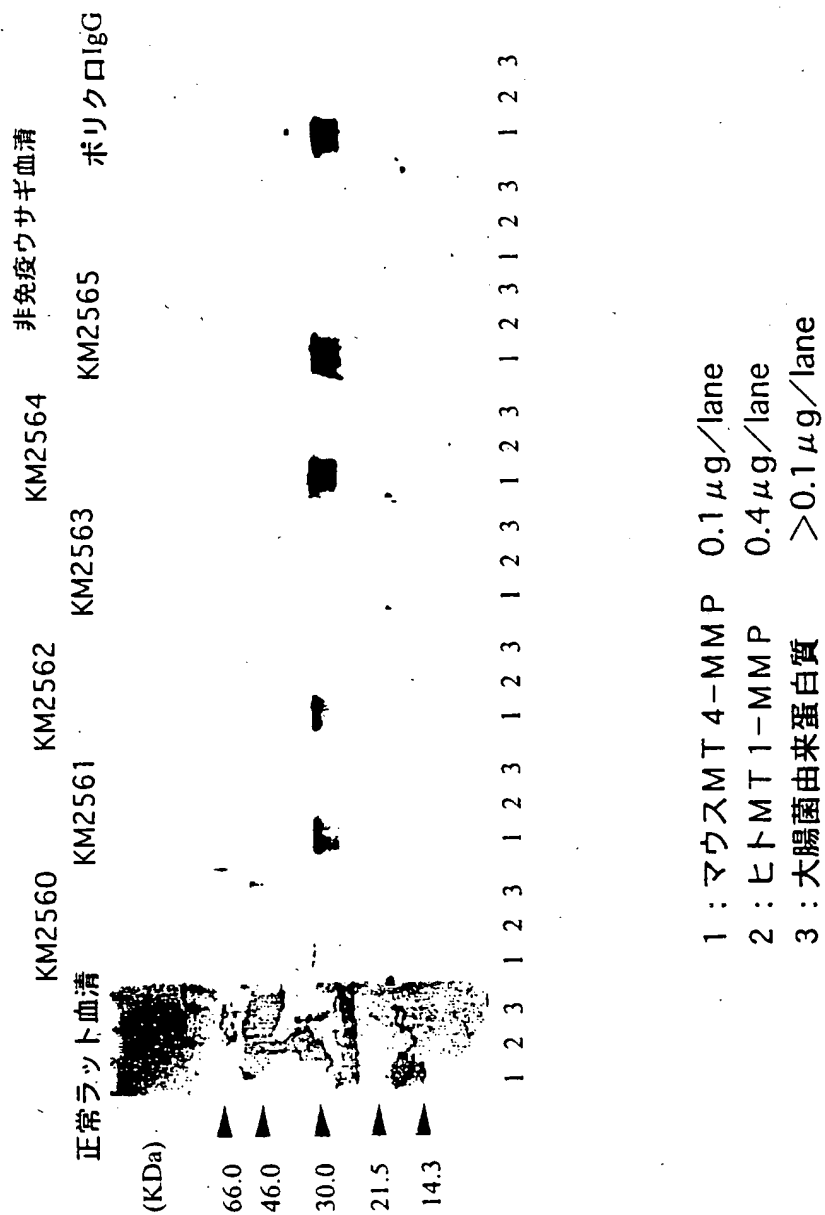


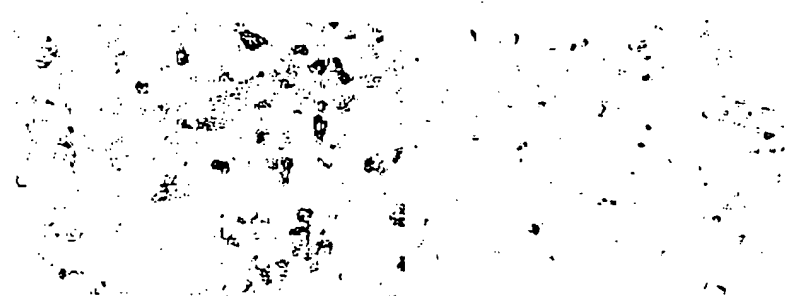
図 3

ヒト MT4-MMP (2) 遺伝子 COS-1 細胞
導入を行った COS-1 細胞

KM2561



KM2562



KM1764



図 4

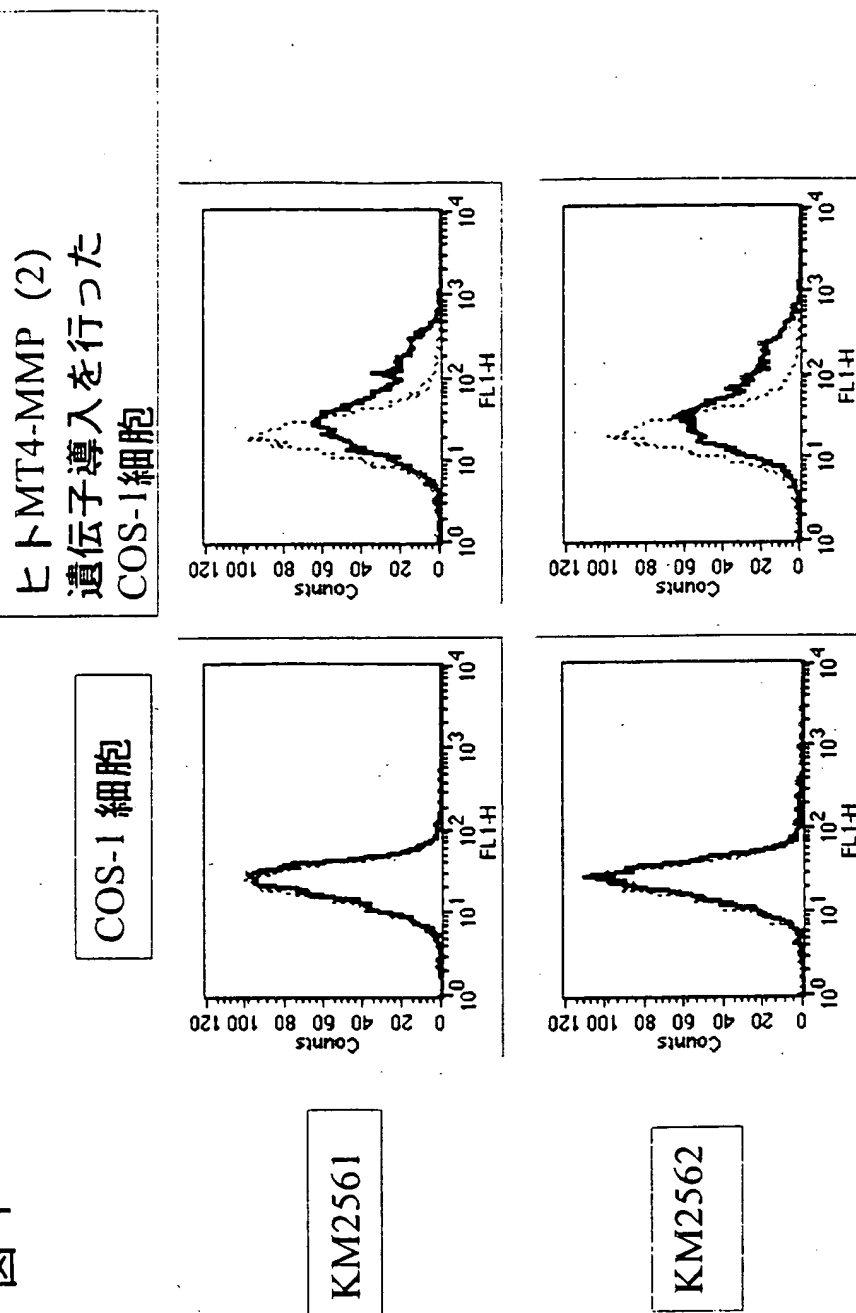
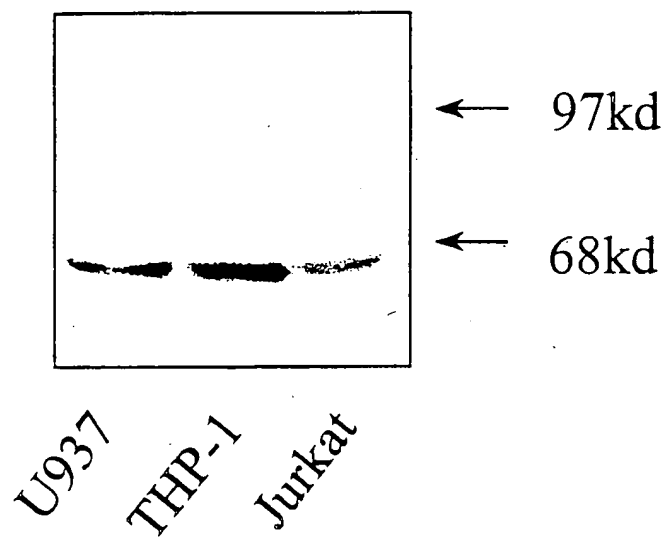


図 5



human	MT1-MMP	1	-----MSPAP-----RP-----SRCLLPL-LTLGTALASLSAQ-----SSFSPEAWLQQYGYLPPGD	49
human	MT2-MMP	1	-----MGSDPSAPGRPGWT-----GSLLDREEARPRLLPL-LLVLLGCLGLGVAED-----AEVHAENWLRLYGYLPQPS	67
human	MT3-MMP	1	-----MILLTFSTGRRLDFVH-----HSGVFFLQT-LLWILCATVCG-----TEQVFNVEVWLQKYGYLPPPTD	57
human	MT4-MMP(2)	1	-----MRRRAARGPGPP-PPGP-----GLSRLLPLPLLLLLALGTRGGCAPEPAR-----RAEDLSLGVEWLSRFGYLPAD	69
human	MT5-MMP	1	-----MPSRSGRAAPGPPPPPPGQAPRWSRWVRVGRLLLL-LLPALCCLPGAARAAAAGAGNRAAVAVAVARADEAEAPAGQNWLSYGYLLPYD	95
mouse	MT5-MMP	1	-----MPSRSGRAAPG-----QASRWSGWRAFGRLLP-LLPALCCLAAAAGACKPAG-----ADAPAGQNWLSYGYLLPYE	68

human	MT1-MMP	50	LRTHQRSQSLSAALAAQKQFYGLQVTGKADADTMKAMRRPRCGVPDKFGAEIKANVRR--KRYAIQGLKWQHNETFCIQNYT--PKVGEYATYEAIR	145
human	MT2-MMP	68	RHMSTMRSAQILASALAEQRFYGIPTGVLDDEETKEWKRPRCGVPDQFGVRVKANLRRRKRKRYALTGRKWNHHLTFSIQNYT--EKLGWYHSMFAVR	165
human	MT3-MMP	58	PRMSVLRSAETMQSALAAQKQFYGINMTCKYDRNTIDWKKPRCGVPDQTRCSSKFIHRR--KRYALTGQKWQHKHITYSIKNVT--PKVGDPETRKAIR	153
human	MT4-MMP(2)	70	PTTGQLQTQEELSKAITAMQFGGLEATGILDEATLALMTKPRCSLPDLVLTQ----ARR--RRQAPATKWNKRNLSWRVTRFRDPSPLGHDTRALMY	164
human	MT5-MMP	96	SRASALHSKALQSAVSTMQGFYGIPTGVLDQTTIEWMKPRCGVPDHPHLSR--RRRN--KRYALTGQKWQHKHITYSIHNYT--PKVGELDTRKAIR	189
mouse	MT5-MMP	69	SRASALHSGKALQSAVSTMQGFYGIPTGVLDQTTIEWMKPRCGVPDHPHLSR--RRRN--KRYALTGQKWQHKHITYSIHNYT--PKVGELDTRKAIR	162
				*
human	MT1-MMP	146	KAFRVWESATPLRFREVPYAYIREGHEKQADIMIFFAEGFHGDSPTFDGEGGLAHAYFPGPN--IGGDTHFDSAEPTWTVRNEIDLNGNDIFLVAVHELCHA	244
human	MT2-MMP	166	RAFRVWEQATPLVFQEPYEDIRLRROKEADIMVLFASGFHGDSSPFDGCTGGFLAHAYFPGPG--LGGDTHFDSADEPTWTSSTDLIGNNLFVAVHELCHA	264
human	MT3-MMP	154	RAFDVWQNVTPLTTFEEVPYSELENGK--RDVDITIFASGFHGDSSPFDGEGGLAHAYFPGPG--IGGDTHFDSDEPTWTLGNPNHNDGNDLFLVAVHELCHA	251
human	MT4-MMP(2)	165	YALKVWSDIAPLNFHIEV-----AGS--TADIQIDFSKADHNDGYPPDARR--HRAHAFPPGHHHTAGYTHFNDDDEAWTFRSDAHGMDLFAVAVHEFGHA	255
human	MT5-MMP	190	QAFDVWQKVTPLTTFEEVPYHEIKSDR--KEADIMIFFASGFHGDSSPFDGEGGLAHAYFPGPG--IGGDTHFDSDEPTWTLGNANHDGNDLFLVAVHELCHA	287
mouse	MT5-MMP	163	QAFDVWQKVTPLTTFEEVPYHEIKSDR--KEADIMIFFASGFHGDSSPFDGEGGLAHAYFPGPG--IGGDTHFDSDEPTWTLGNANHDGNDLFLVAVHELCHA	260

human	MT1-MMP	245	LGLEHSSDPSAIMAPFYQWMDTE--NFVLPDDRRRGIQQLYGGESG-----FPTKMPQP-----RTTSRPSVPDKPNP-----	312
human	MT2-MMP	265	LGLEHSSNPNAIMAPFYQWKDVD--NFKLPEDDLRGILQLYGTPDGGQPTQLPTVTPRRPG-----RPDHRPPPPQPPPPGKPERPPKPPVQPR	357
human	MT3-MMP	252	LGLEHSDPTAIMAPFYQVMEITD--NFKLPNDLLQGIQKIYGPDPKIPPTTRPLTPVPHRSIPPADPRKNDR--PKPPRPPPTG-----	331
human	MT4-MMP(2)	256	LGLSHVAAAHSIMRPPYQGVDPRLRYGLPYEDKVRVWQLYGVRESVSTAQ--PEEPPLLPE-----PPDNRSSAPPRKD-----	329
human	MT5-MMP	288	LGLEHSSDPSAIMAPFYQVMETH--NFKLPQDDLQGIQKIYGPAPLEPTRLPTLTVRRIHSPSE--RKHERQPPRPPPLGD-----	368
mouse	MT5-MMP	261	LGLEHSDPSAIMAPFYQVMETH--NFKLPQDDLQGIQKIYGPAPLEPTRLPTLTVRRIHSPSE--RKHERQPPRPPPLGD-----	341

human	MT1-MMP	313	-----TYGPNICDGNFDTVAMLRGEMFVFKKRWFRVRNNQ-VMDGYPMPIGQFWRGLP---ASINTAYER-KDGKVFVFKGDKHWVDFDEASLEPGYPK	401
human	MT2-MMP	358	ATERPDQYGPNICDGEDFTVAMLRGEMFVFKGRWFRVRNNR-VLDNYPMPIGHFWRGGLP---GDISAAYER-QDGRFVFFKGDYWLFRANLEPGYPQ	452
human	MT3-MMP	332	-RPSYPGAKPNICDGNFNTLAIRREMVFVKDQWFRVRNNR-VMDGYPMQITYFWRGLP---PSIDAYEN-SDGNFVFFKGNKYWVFKDITLQPGYPH	425
human	MT4-MMP(2)	330	-----VPHRCSTHFDVAQIRGEAFFKGYFWRLTRDRHLVSLQPAQMRFWRGGLPLHDSVDAYVERTSDHKIVFFKGDYWVFKDNNVEEGYPR	421
human	MT5-MMP	369	-RPSTPCTKPNICDGNFNTVALFRGEMFVKDRWFRVRNNR-VQEGYPMQIEQFWKGLP---ARIDAAYER-ADGRFVFFKGDYWVFKDNNVEEGYPR	462
mouse	MT5-MMP	342	-RPSTPCKPNICDGNFNTVALFRGEMFVKDRWFRVRNNR-VQEGYPMQIEQFWKGLP---ARIDAAYER-ADGRFVFFKGDYWVFKDNNVEEGYPR	435
* * * * *				
human	MT1-MMP	402	HIKELGRGLPTDKIDAALFWMPNCKTYFRGNKYRFRNEELRAVDSEYPKNIKWEGIPESPRGSMGSDDEVFTYFKGNKYWKFNNQKLKVEPGYPKSA	501
human	MT2-MMP	453	PLTSYGLGIPYDRIDTAIWWEPTGHTFFQEDRYRFRNEETQRGDPCYPKPISVWQGI PASPKGAFLSNDAAYTYFKGTYWKFDNERLRMEPGYPKSI	552
human	MT3-MMP	426	-DLITLGSGLPHGIDSAIWWEDVGKTYFKGDRYRFRNEETQRGDPCYPKPIVWKGI PESPGQAFVHKENGFTYFKGKEYWKFNQILKVEPGYPRSI	525
human	MT4-MMP(2)	422	PVSDFS--LPPGGIDAAFSAWANDRTYFFKDQLWRYDDHTRMDPGYPAQSPWRGVSTLDDMRWSDG-ASYFFRCQGYWKVLDGELEVAAPGPQST	518
human	MT5-MMP	463	SLGELGSLPREGIDTALRWEPVCKTYFFKGERYWRYSERRATDPGYPKPIVWKGIPOAPQGAFISKEGYTYTYFKGRDYWKFDNQKLSVEPGYPRNI	562
mouse	MT5-MMP	436	SLGELGSLPREGIDTALRWEPVCKTYFFKGERYWCYSEERRATDPGYPKPIVWKGIPOAPQGAFISKEGYTYTYFKGRDYWKFDNQKLSVEPGYPRNI	535
* * * * *				
human	MT1-MMP	502	LRDWMGCPGGRDE-----GTEETEVIIEVDE-----EGGG-----AVSAAVVLPLVLLLVAVGLAVFFFRH	565
human	MT2-MMP	553	LRDFMGCEHVEPGPRWPDVARPPFNPHGCAEPCADSAEGDVGDDGDFGAGVKNKDGSRVVVQMEEVARTVNVVMVLVPLLLLCVTLGLTYALVQMQRK	652
human	MT3-MMP	526	LKDFMGCDG-PTDRVKEGH-----SPDDVDIVIKLNTAS-----TVKAIIVIPICILALCLLVLYVTYVQFKRK	590
human	MT4-MMP(2)	519	ARDWLVCGDSQADGSAAGVDAAE-----GPRAPPGQHDQSRSEDGYEVC-----SCTSGASSPPGAPGLVAATMLLLPP---	590
human	MT5-MMP	563	LRDWMGCKQEVERKERR-----LPQDDVDIMVTINDVPG-----SYNAVAVVIPCILSLCILVLVYTYIFQFKNK	628
mouse	MT5-MMP	536	LRDWMGCKQEVERKERR-----LPQDDVDIMVTIDDVPG-----SYNAVAVVVPCTLSLCLLVLLYTYIFQFKNK	601
* * * * *				
human	MT1-MMP	566	GTPRRLLYCQSRLLDKV	582
human	MT2-MMP	653	GAPRVLLYCKRSLQEW	669
human	MT3-MMP	591	GTPRHILYCKRSMQEW	607
human	MT4-MMP(2)	591	LSPGALWTAQAQALTL--	605
human	MT5-MMP	629	TGPQPVTYKRPVQEW	645
mouse	MT5-MMP	602	AGPQPVTYKRPVQEW	618

図 6 の つづ き

図7

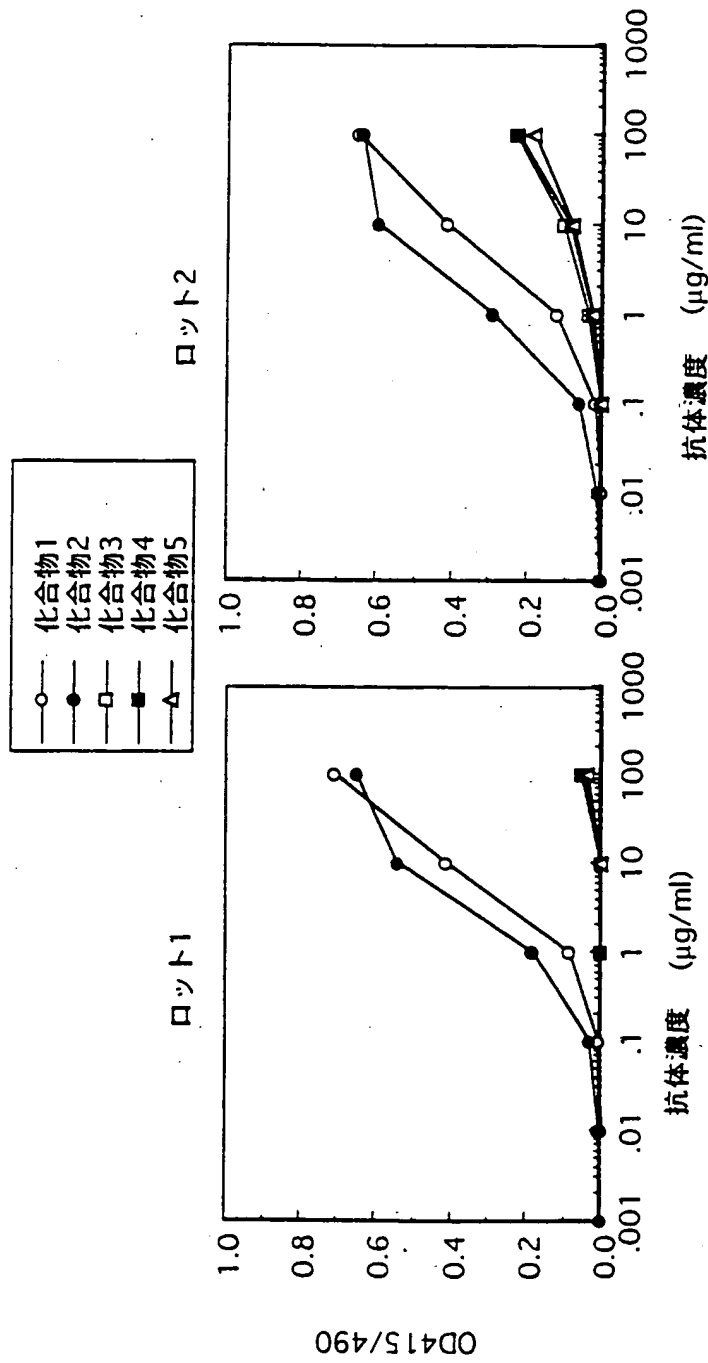
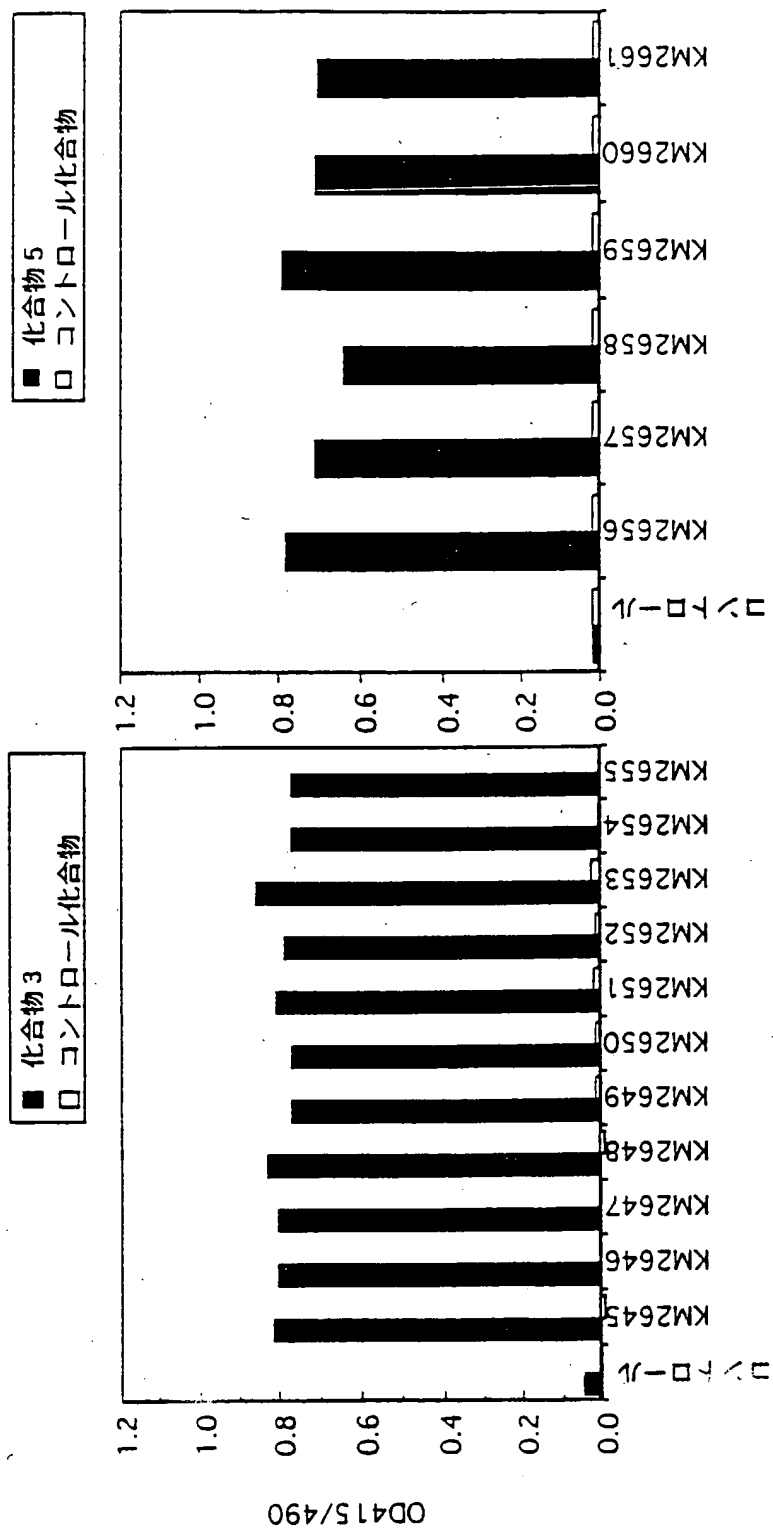
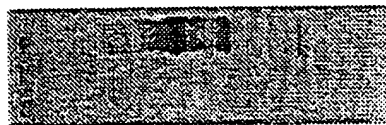


図 8



9
[X]



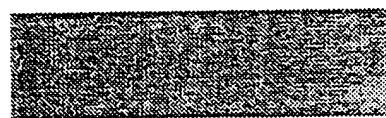
KM2658



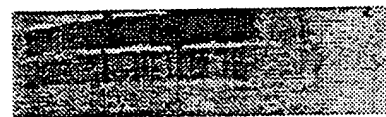
KM2655



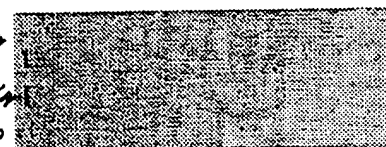
anti MT4-MMP MoAb KM2561



control Ab(rat Ig G1)



anti FLAG MoAb

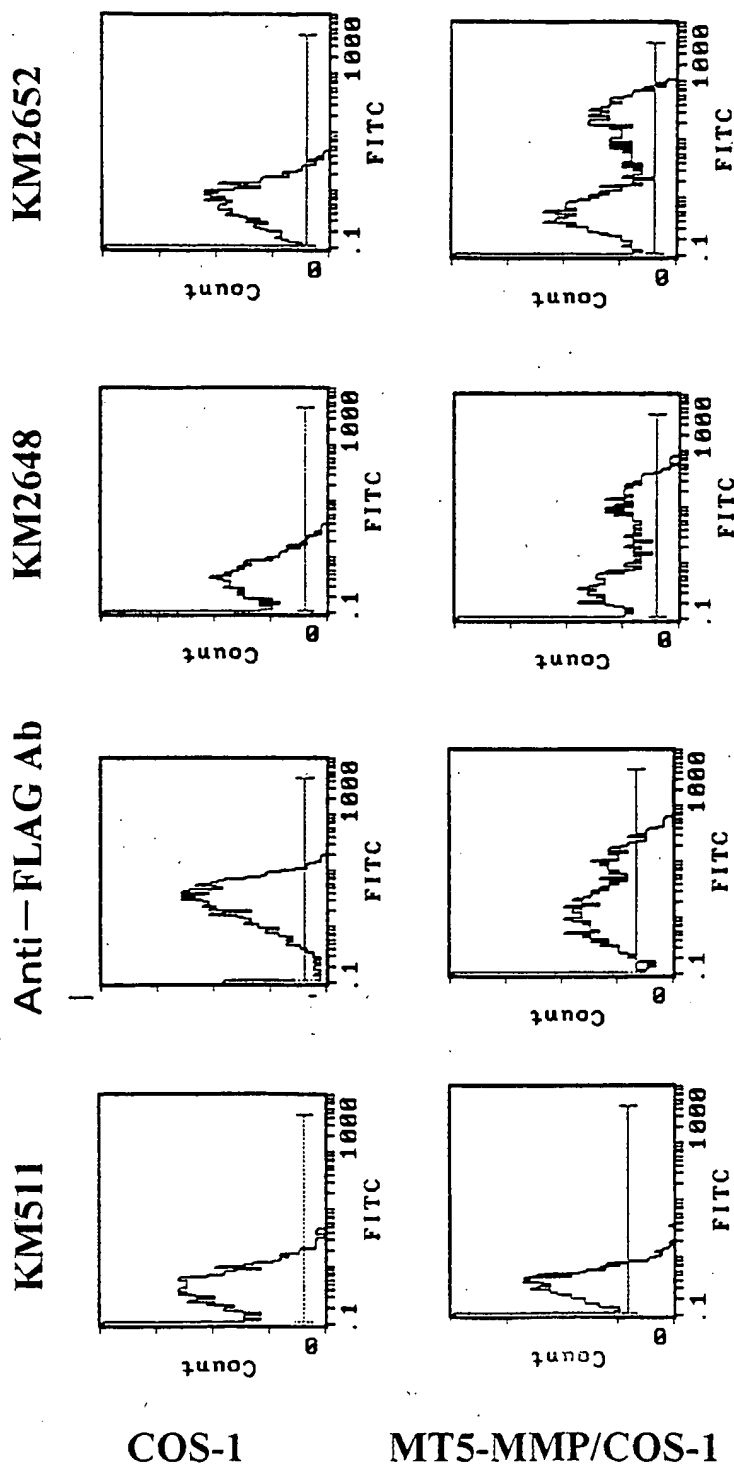


control Ab(mouse Ig G1)

MT4-MMP/COS-1
MT5-MMP/COS-1
COS-1

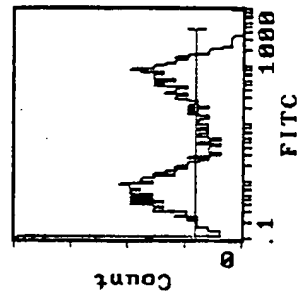
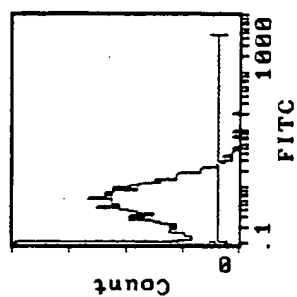
220k
97.4k
66k
46k
30k
21.5k
14.3k

10

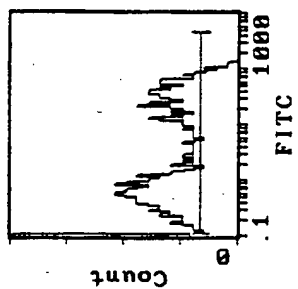
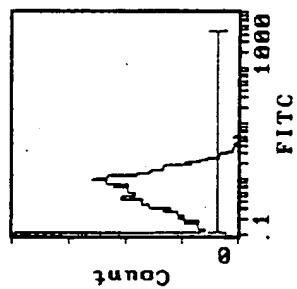


11

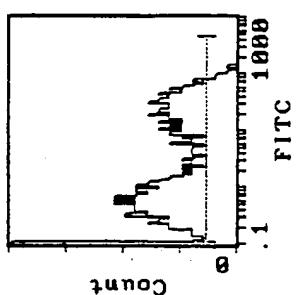
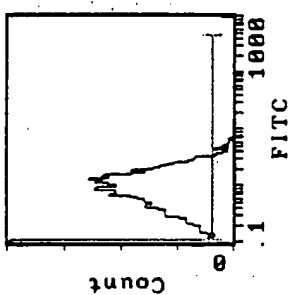
KM2655



KM2654



KM2653

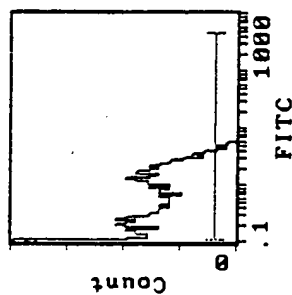
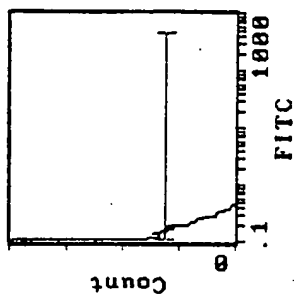


COS-1

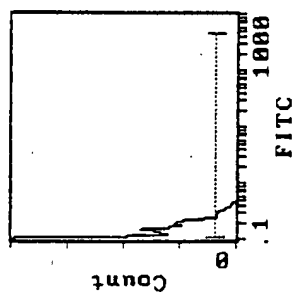
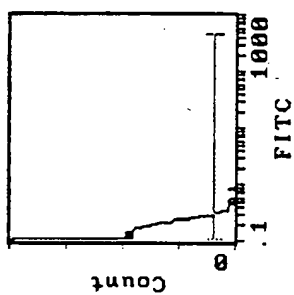
MT5-MMP/COS-1

12

KM2658



KM511



COS-1

MT5-MMP/COS-1

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> NOVEL ANTIBODY, MEDICAMENT COMPRISING SAID ANTIBODY, AND METHOD OF
SCREENING COMPOUNDS USING SAID ANTIBODY

<130> PH-669-PCT

<140>

<141>

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 587

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Gly Arg Arg Pro Arg Gly Pro Gly Ser Pro Arg Gly Pro Gly Pro
1 5 10 15

Pro Arg Pro Gly Pro Gly Leu Pro Pro Leu Leu Leu Val Leu Ala Leu
20 25 30

Ala Ala His Gly Gly Cys Ala Ala Pro Ala Pro Arg Ala Glu Asp Leu

35

40

45

Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala

50

55

60

Asp Pro Ala Ser Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala

65

70

75

80

Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Thr Thr Gly Ile Leu

85

90

95

Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro

100

105

110

Asp Leu Pro Pro Gly Ala Gln Ser Arg Arg Lys Arg Gln Thr Pro Pro

115

120

125

Pro Thr Lys Trp Ser Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe

130

135

140

Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly Arg Asp Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr

145

150

155

160

Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Thr Pro Leu Asn Phe His Glu

165

170

175

Val Ala Gly Asn Ala Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp

180

185

190

His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Gly Thr Val Ala His

195

200

205

Ala Phe Phe Pro Gly Asp His His Thr Ala Gly Asp Thr His Phe Asp

210

215

220

Asp Asp Glu Pro Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala His Gly Met Asp

225

230

235

240

Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile Gly Leu Ser

245

250

255

His Val Ala Ala Pro Ser Ser Ile Met Gln Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro

260

265

270

Val Gly Asp Pro Val Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp Arg Val Arg

275

280

285

Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln

290

295

300

Leu Asp Thr Pro Glu Pro Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro

305

310

315

320

Asn Asn Arg Ser Ser Thr Pro Pro Gln Lys Asp Val Pro His Arg Cys

325

330

335

Thr Ala His Phe Asp Ala Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe

340

345

350

Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val
355 360 365

Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu
370 375 380

His Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys
385 390 395 400

Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn
405 410 415

Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro
420 425 430

Gly Gly Ile Asp Ala Val Phe Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr
435 440 445

Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg Arg
450 455 460

Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Gly Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro
465 470 475 480

Ser Met Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe
485 490 495

Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Ala
500 505 510

Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly

515

520

525

Glu Pro Leu Ala Asp Ala Glu Asp Val Gly Pro Gly Pro Gln Gly Arg

530

535

540

Ser Gly Ala Gln Asp Gly Leu Ala Val Cys Ser Cys Thr Ser Asp Ala

545

550

555

560

His Arg Leu Ala Leu Pro Ser Leu Leu Leu Leu Thr Pro Leu Leu Trp

565

570

575

Gly Leu Trp Thr Ser Val Ser Ala Lys Ala Ser

580

585

<210> 2

<211> 605

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Arg Arg Ala Ala Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro

1

5

10

15

Gly Leu Ser Arg Leu Pro Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu

20

25

30

Ala Leu Gly Thr Arg Gly Gly Cys Ala Ala Pro Glu Pro Ala Arg Arg

35 40 45
Ala Glu Asp Leu Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr
50 55 60
Leu Pro Pro Ala Asp Pro Thr Thr Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu
65 70 75 80
Leu Ser Lys Ala Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Ala
85 90 95
Thr Gly Ile Leu Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg
100 105 110
Cys Ser Leu Pro Asp Leu Pro Val Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg Arg
115 120 125
Gln Ala Pro Ala Pro Thr Lys Trp Asn Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg
130 135 140
Val Arg Thr Phe Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly His Asp Thr Val Arg
145 150 155 160
Ala Leu Met Tyr Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Ala Pro Leu
165 170 175
Asn Phe His Glu Val Ala Gly Ser Thr Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe
180 185 190

Ser Lys Ala Asp His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Ala Arg Arg His
195 200 205

Arg Ala His Ala Phe Phe Pro Gly His His His Thr Ala Gly Tyr Thr
210 215 220

His Phe Asn Asp Asp Glu Ala Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala His
225 230 235 240

Gly Met Asp Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile
245 250 255

Gly Leu Ser His Val Ala Ala Ala His Ser Ile Met Arg Pro Tyr Tyr
260 265 270

Gln Gly Pro Val Gly Asp Pro Leu Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp
275 280 285

Lys Val Arg Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro
290 295 300

Thr Ala Gln Pro Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asp Asn
305 310 315 320

Arg Ser Ser Ala Pro Pro Arg Lys Asp Val Pro His Arg Cys Ser Thr
325 330 335

His Phe Asp Ala Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe Lys
340 345 350

Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu

355

360

365

Gln Pro Ala Gln Met His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu

370

375

380

Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val

385

390

395

400

Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu

405

410

415

Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly

420

425

430

Ile Asp Ala Ala Phe Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe

435

440

445

Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg His Met Asp

450

455

460

Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Ser Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Thr

465

470

475

480

Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg

485

490

495

Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Val Ala Pro

500 505 510
Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Asp Ser
515 520 525
Gln Ala Asp Gly Ser Val Ala Ala Gly Val Asp Ala Ala Glu Gly Pro
530 535 540
Arg Ala Pro Pro Gly Gln His Asp Gln Ser Arg Ser Glu Asp Gly Tyr
545 550 555 560
Glu Val Cys Ser Cys Thr Ser Gly Ala Ser Ser Pro Pro Gly Ala Pro
565 570 575
Gly Pro Leu Val Ala Ala Thr Met Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Ser
580 585 590
Pro Gly Ala Leu Trp Thr Ala Ala Gln Ala Leu Thr Leu
595 600 605

<210> 3

<211> 3517

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (86)..(1846)

<400> 3

ggcacgaggg cgcgagccg agcgaggcgc ggagctggct gctggcgggt gcggggaccc 60

tcgccacccg acctgggaga gcggg atg gga cgc cgc ccg cgg gga cct ggg 112

Met Gly Arg Arg Pro Arg Gly Pro Gly

1

5

tcc ccc cgg gga cct ggc cct cca cgc ccc ggg ccg ggg ctg cca cca 160

Ser Pro Arg Gly Pro Gly Pro Pro Arg Pro Gly Pro Gly Leu Pro Pro

10

15

20

25

ctg ctg ctt gta ctg gcg ctg gcg gcc cat ggg ggc tgc gca gcg ccc 208

Leu Leu Leu Val Leu Ala Leu Ala Ala His Gly Gly Cys Ala Ala Pro

30

35

40

gcg ccc cgc gcg gag gac ctc agc ctc ggg gtg gag tgg cta agc agg 256

Ala Pro Arg Ala Glu Asp Leu Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg

45

50

55

ttt ggc tac ctg ccg cct gca gat ccg gca tca ggg cag cta cag acc 304

Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala Asp Pro Ala Ser Gly Gln Leu Gln Thr

60

65

70

cag gag gaa ctg tcc aaa gcg att act gcc atg cag cag ttt ggt ggt 352

Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly

75

80

85

ctg gag acc act ggc atc cta gat gag gcc act ctg gcc ctg atg aaa 400

Leu Glu Thr Thr Gly Ile Leu Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys

90	95	100	105	
acc cct cga tgc tcc ctt ccg gac ctg ccc cct ggg gcc caa tcg aga				448
Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro Asp Leu Pro Pro Gly Ala Gln Ser Arg				
	110	115	120	
agg aag cgg cag act cca ccc cca acc aaa tgg agc aag agg aac ctt				496
Arg Lys Arg Gln Thr Pro Pro Pro Thr Lys Trp Ser Lys Arg Asn Leu				
	125	130	135	
tct tgg agg gtc cgg aca ttc cca cgg gac tca ccc ctg ggc cgg gat				544
Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly Arg Asp				
	140	145	150	
act gtg cgt gca ctc atg tac tac gcc ctc aaa gtc tgg agt gac atc				592
Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile				
	155	160	165	
aca ccc ttg aac ttc cac gag gta gcg ggc aac gcg gcg gac atc cag				640
Thr Pro Leu Asn Phe His Glu Val Ala Gly Asn Ala Ala Asp Ile Gln				
	170	175	180	185
atc gac ttc tcc aag gcc gac cac aat gac ggc tac ccc ttc gat ggc				688
Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly				
	190	195	200	
cct ggt ggc acg gtg gcc cac gca ttc ttc cct ggt gac cac cac acg				736
Pro Gly Gly Thr Val Ala His Ala Phe Phe Pro Gly Asp His His Thr				
	205	210	215	

gca ggg gac acc cac ttt gat gac gat gag cca tgg acc ttc cgt tcc 784

Ala Gly Asp Thr His Phe Asp Asp Asp Glu Pro Trp Thr Phe Arg Ser

220

225

230

tca gat gcc cac ggg atg gac ctg ttt gca gtg gcc gtc cat gag ttt 832

Ser Asp Ala His Gly Met Asp Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe

235

240

245

ggt cat gcc att ggt ctg agc cat gtt gcc gcc cca agc tcc atc atg 880

Gly His Ala Ile Gly Leu Ser His Val Ala Ala Pro Ser Ser Ile Met

250

255

260

265

caa ccg tac tac cag ggc ccc gtg ggt gac ccc gta cgc tat gga ctt 928

Gln Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro Val Gly Asp Pro Val Arg Tyr Gly Leu

270

275

280

ccc tat gag gac agg gtg cgt gtc tgg cag ttg tac ggt gtg cgg gaa 976

Pro Tyr Glu Asp Arg Val Arg Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu

285

290

295

tcc gtg tcc cct act gcc cag ctg gat acc cca gag ccc gag gag cca 1024

Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln Leu Asp Thr Pro Glu Pro Glu Glu Pro

300

305

310

ccc ctc ctg cca gag ccc ccc aac aat cgg tct agc act ccg ccc cag 1072

Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asn Asn Arg Ser Ser Thr Pro Pro Gln

315

320

325

aag gac gtg cct cac agg tgc act gcc cac ttt gat gct gtg gcc cag 1120
Lys Asp Val Pro His Arg Cys Thr Ala His Phe Asp Ala Val Ala Gln
330 335 340 345

att cga ggc gaa gca ttc ttt ttc aaa ggc aag tat ttc tgg agg ctg 1168
Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu
350 355 360

acc cgg gac cga cac ttg gtg tgc ctg cag ccg gct caa atg cat cgc 1216
Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg
365 370 375

ttc tgg cgg ggc ctg ccg ctg cac ctg gac agt gtg gac gcc gtg tat 1264
Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr
380 385 390

gag cgt acc agt gac cac aag att gtc ttc ttc aaa gga gac aga tac 1312
Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr
395 400 405

tgg gtg ttt aag gac aac aac gta gag gaa ggg tac ccg cga cct gtc 1360
Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val
410 415 420 425

tcc gac ttc agc ctc ccg cca ggt ggc atc gat gct gtc ttc tcc tgg 1408
Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly Ile Asp Ala Val Phe Ser Trp
430 435 440

gcc cac aat gac agg act tat ttc ttt aag gac cag ctg tac tgg cgc 1456

Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg	
445	450 455
tat gat gac cac aca cgg cgc atg gac cct ggc tac cct gcc cag gga	1504
Tyr Asp Asp His Thr Arg Arg Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Gly	
460	465 470
ccc ctg tgg aga ggt gtc ccc agc atg ttg gat gat gcc atg cgc tgg	1552
Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Met Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp	
475	480 485
tct gat ggt gca tcc tat ttc ttc cga ggc cag gag tac tgg aaa gtg	1600
Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val	
490	495 500 505
ctg gat ggc gag ctg gaa gca gcc ccc ggg tac cca cag tct aca gcc	1648
Leu Asp Gly Glu Leu Glu Ala Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala	
510	515 520
cgc gac tgg ctg gta tgc ggt gag ccg ctg gcg gat gcg gag gat gta	1696
Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Glu Pro Leu Ala Asp Ala Glu Asp Val	
525	530 535
ggg cct gga ccc cag ggc cgc agt ggg gcc caa gat ggt ctg gca gta	1744
Gly Pro Gly Pro Gln Gly Arg Ser Gly Ala Gln Asp Gly Leu Ala Val	
540	545 550
tgt tcc tgc act tca gac gca cac agg ttg gca ctg cca tct ctg ctg	1792
Cys Ser Cys Thr Ser Asp Ala His Arg Leu Ala Leu Pro Ser Leu Leu	

555

560

565

ctt ctg act cca ctg ctg tgg ggc ctg tgg acc tca gtc tct gcc aag 1840
Leu Leu Thr Pro Leu Leu Trp Gly Leu Trp Thr Ser Val Ser Ala Lys
570 575 580 585

gca tcc tgagggcagt gctagccttg cggatcaagg agccagggga gcagggacac 1896
Ala Ser

actggccagt actcagcagg acttgtgctc caagcttccg gtccctcgct ccttccttcc 1956

ttccttcctt gaaccaggg gtgctgtgcc atctgtgga gtggtctcca gctgggacag 2016

gagtcaccac caagggcatc catgcacacc ttgcctacct ggagcagcca taggcagctc 2076

cccttcctc ctctgcacat cacgtgctt cgttgacct tgccgggctg cccaagccca 2136

gtgtgcacaa ccccaggatg ccttgtctgc acctgagcgg ctctgatggc atctgcacgt 2196

gggctgatga ggggcaaaca ggggttcctc gtggtatccg taggggccac catgcctgtt 2256

tcacaagtaa gagagttagt gccccgatgg gggaacaggg tgggagaaag gcacctaccc 2316

agaagtctga tccactgccg ttgacagcag ccagcgccgt atctgtctggg ataggggacc 2376

agtcacactc aggatctgcc cacagattcc cagatgtctg caaggggcct tgcaccaact 2436

accaggagca cagccacctc tccccgtcct agataggtta gccatggagg ctgtgtcctg 2496

ttatctccct ctctttggcc aggagagcat tgtgggtctc cctcgggtgc tgttgatggg 2556

ggtggggggc gcccatagag atatttcttc atctgtcagt acccattgct tcagcaagat 2616

gccccatat agttctggcc tgagaccctg cagcttggac tcacagctgt cccctcccca 2676

gctgcagaag ggcttctaac acctggaata aagggtggcg ttcagtttag ggaaggagga 2736

tggttggggg agcccagggt gatagcaagg gggagctgca gggataagtg tcagggtcct 2796

cggggagtca tgacaatgtt accgcctaac ttggagatgt aggagctgtg cacggattgc 2856

ttctctgggt gacaaacctc catgggccag aaaggggctg aggttgaacc caagatgggt 2916

taatgagctc cagaaaggaa cagccaagtt caaagttctt gggacaagac gggcctgagg 2976

aacagggccca cccaggtagg cgtggctgta gggttaagcag tttctgtcat tgggcacgag 3036

atgaaaatta gtgatcacac gcacataccc cctccccaat ctggcccggg cccatctcag 3096

gtaagaaagg cttctgtcta cccaggcca gggttgagtg ttgtcaggat gaggagcag 3156

ctagcggggc ctaagtttct accctccatt tcccaagcct ggccacaccc tagaccctg 3216

tcagactagg caggacagag tcagggtag gggcatctga gggttcctg tcttggaagc 3276

cacctactc tgccctcata tcaaagcag ctccatgat gtccatgtt gtccaccagc 3336

ctgcaggaca cagatgtcct atacagcaac agggaaagtc caaaaatctt tgtcacatag 3396

cactgaaaac cagacccgca ggctggagct gtctagatgc tgggtgcaca ctcatTTTaa 3456

aacccaaact ctttaataaaa atTTTgtaca ctggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3516

a 3517

<210> 4

<211> 2423

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (100)..(1914)

<400> 4

ccggcggggg cgccgcggag agcggagggc gccgggctgc ggaacgcgaa gcggaggggcg 60

cgggaccctg cagccgccc gcgggcccat gtgagcgcc atg cgg cgc cgc gca 114

Met Arg Arg Arg Ala

1 5

gcc cgg gga ccc ggc ccg ccg ccc cca ggg ccc gga ctc tcg cgg ctg 162

Ala Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Pro Gly Pro Gly Leu Ser Arg Leu

10

15

20

ccg ctg ctg ccg ctg ccg ctg ctg ctg ctg gcg ctg ggg acc cgc 210

Pro Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Thr Arg

25 30 35
ggg ggc tgc gcc gcg ccg gaa ccc gcg cgg cgc gcc gag gac ctc agc 258
Gly Gly Cys Ala Ala Pro Glu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Asp Leu Ser
40 45 50
ctg gga gtg gag tgg cta agc agg ttc ggt tac ctg ccc ccg gct gac 306
Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala Asp
55 60 65
ccc aca aca ggg cag ctg cag acg caa gag gag ctg tct aag gcc atc 354
Pro Thr Thr Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala Ile
70 75 80 85
aca gcc atg cag cag ttt ggt ggc ctg gag gcc acc ggc atc ctg gac 402
Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Ala Thr Gly Ile Leu Asp
90 95 100
gag gcc acc ctg gcc ctg atg aaa acc cca cgc tgc tcc ctg cca gac 450
Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro Asp
105 110 115
ctc cct gtc ctg acc cag gct cgc agg aga cgc cag gct cca gcc ccc 498
Leu Pro Val Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg Arg Gln Ala Pro Ala Pro
120 125 130
acc aag tgg aac aag agg aac ctg tcg tgg agg gtc cgg acg ttc cca 546
Thr Lys Trp Asn Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe Pro
135 140 145

cgg gac tca cca ctg ggg cac gac acg gtg cgt gca ctc atg tac tac 594
 Arg Asp Ser Pro Leu Gly His Asp Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr Tyr
 150 155 160 165

gcc ctc aag gtc tgg agc gac att gcg ccc ctg aac ttc cac gag gtg 642
 Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Ala Pro Leu Asn Phe His Glu Val
 170 175 180

gcg ggc agc acc gcc gac atc cag atc gac ttc tcc aag gcc gac cat 690
 Ala Gly Ser Thr Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp His
 185 190 195

aac gac ggc tac ccc ttc gac gcc cgg cgg cac cgt gcc cac gcc ttc 738
 Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Ala Arg Arg His Arg Ala His Ala Phe
 200 205 210

ttc ccc ggc cac cac cac acc gcc ggg tac acc cac ttt aac gat gac 786
 Phe Pro Gly His His His Thr Ala Gly Tyr Thr His Phe Asn Asp Asp
 215 220 225

gag gcc tgg acc ttc cgc tcc tcg gat gcc cac ggg atg gac ctg ttt 834
 Glu Ala Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala His Gly Met Asp Leu Phe
 230 235 240 245

gca gtg gct gtc cac gag ttt ggc cac gcc att ggg tta agc cat gtg 882
 Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile Gly Leu Ser His Val
 250 255 260

gcc gct gca cac tcc atc atg cgg ccg tac tac cag ggc ccg gtg ggt 930
 Ala Ala Ala His Ser Ile Met Arg Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro Val Gly
 265 270 275

gac ccg ctg cgc tac ggg ctc ccc tac gag gac aag gtg cgc gtc tgg 978
 Asp Pro Leu Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp Lys Val Arg Val Trp
 280 285 290

cag ctg tac ggt gtg cgg gag tct gtg tct ccc acg gcg cag ccc gag 1026
 Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln Pro Glu
 295 300 305

gag cct ccc ctg ctg ccg gag ccc cca gac aac cgg tcc agc gcc ccg 1074
 Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asp Asn Arg Ser Ser Ala Pro
 310 315 320 325

ccc agg aag gac gtg ccc cac aga tgc agc act cac ttt gac gcg gtg 1122
 Pro Arg Lys Asp Val Pro His Arg Cys Ser Thr His Phe Asp Ala Val
 330 335 340

gcc cag atc cgg ggt gaa gct ttc ttc ttc aaa ggc aag tac ttc tgg 1170
 Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp
 345 350 355

cgg ctg acg cgg gac cgg cac ctg gtg tcc ctg cag ccg gca cag atg 1218
 Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met
 360 365 370

cac cgc ttc tgg cgg ggc ctg ccg ctg cac ctg gac agc gtg gac gcc 1266

His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu Asp Ser Val Asp Ala

375

380

385

gtg tac gag cgc acc agc gac cac aag atc gtc ttc ttt aaa gga gac 1314

Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp

390

395

400

405

agg tac tgg gtg ttc aag gac aat aac gta gag gaa gga tac ccg cgc 1362

Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg

410

415

420

ccc gtc tcc gac ttc agc ctc ccg cct ggc ggc atc gac gct gcc ttc 1410

Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly Ile Asp Ala Ala Phe

425

430

435

tcc tgg gcc cac aat gac agg act tat ttc ttt aag gac cag ctg tac 1458

Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr

440

445

450

tgg cgc tac gat gac cac acg agg cac atg gac ccc ggc tac ccc gcc 1506

Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg His Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala

455

460

465

cag agc ccc ctg tgg agg ggt gtc ccc agc acg ctg gac gac gcc atg 1554

Gln Ser Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Thr Leu Asp Asp Ala Met

470

475

480

485

cgc tgg tcc gac ggt gcc tcc tac ttc ttc cgt ggc cag gag tac tgg 1602

Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp

490 495 500
aaa gtg ctg gat ggc gag ctg gag gtg gca ccc ggg tac cca cag tcc 1650
Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Val Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser
505 510 515
acg gcc cgg gac tgg ctg gtg tgt gga gac tca cag gcc gat gga tct 1698
Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Asp Ser Gln Ala Asp Gly Ser
520 525 530
gtg gct gcg ggc gtg gac gcg gca gag ggg ccc cgc gcc cct cca gga 1746
Val Ala Ala Gly Val Asp Ala Ala Glu Gly Pro Arg Ala Pro Pro Gly
535 540 545
caa cat gac cag agc cgc tcg gag gac ggt tac gag gtc tgc tca tgc 1794
Gln His Asp Gln Ser Arg Ser Glu Asp Gly Tyr Glu Val Cys Ser Cys
550 555 560 565
acc tct ggg gca tcc tct ccc ccg ggg gcc cca ggc cca ctg gtg gct 1842
Thr Ser Gly Ala Ser Ser Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Val Ala
570 575 580
gcc acc atg ctg ctg ctg ctg ccg cca ctg tca cca ggc gcc ctg tgg 1890
Ala Thr Met Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Ser Pro Gly Ala Leu Trp
585 590 595
aca gcg gcc cag gcc ctg acg cta tgacacacag cgcgagccca tgagaggaca 1944
Thr Ala Ala Gln Ala Leu Thr Leu
600 605

gaggcgggtgg gacagcctgg ccacagaggg caaggactgt gccggagtcc ctgggggagg 2004

tgctggcgcg ggaigaggac gggccaccct ggcaccggaa ggccagcaga gggcacggcc 2064

cgccagggtc gggcaggctc aggtggcaag gacggagctg tcccctagtg agggactgtg 2124

ttgactgacg agccgagggg tggccgctcc agaaggggtg ccagtcaggc cgcaccgccg 2184

ccagcctcct ccggccctgg agggagcctc tcgggctggg ggcccacccc tctctgtgcc 2244

ggcgccacca accccaccca cactgtgtcc tgggtgtccc gccggccac agggcctccg 2304

tccccaggtc cccagtgggg cagccctccc cacagacgag cccccacat ggtgccgcgg 2364

cacgtccccc ctgtgacgcg ttccagacca acatgacctc tccctgcttt gtagcgcc 2423

<210> 5

<211> 618

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 5

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly Gln Ala Ser Arg

1

5

10

15

Irp Ser Gly Trp Arg Ala Pro Gly Arg Leu Leu Pro Leu Leu Pro Ala

20

25

30

Leu Cys Cys Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Lys Pro Ala Gly Ala

35

40

45

Asp Ala Pro Phe Ala Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu

50

55

60

Leu Pro Tyr Glu Ser Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Gly Lys Ala Leu

65

70

75

80

Gln Ser Ala Val Ser Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr

85

90

95

Gly Val Leu Asp Gln Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys

100

105

110

Gly Val Pro Asp His Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Arg Asn Lys Arg

115

120

125

Tyr Ala Leu Thr Gly Gln Lys Trp Arg Gln Lys His Ile Thr Tyr Ser

130

135

140

Ile His Asn Tyr Thr Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala

145

150

155

160

Ile Arg Gln Ala Phe Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe

165

170

175

Glu Glu Val Pro Tyr His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp

180

185

190

Ile Met Ile Phe Phe Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe

195

200

205

Asp Gly Glu Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly

210

215

220

Ile Gly Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly

225

230

235

240

Asn Ala Asn His Asp Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu

245

250

255

Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Asn Asp Pro Ser Ala Ile

260

265

270

Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu Thr His Asn Phe Lys Leu Pro

275

280

285

Gln Asp Asp Leu Gln Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu

290

295

300

Pro Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu His Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile

305

310

315

320

His Ser Pro Ser Glu Arg Lys His Glu Arg His Pro Arg Pro Pro Arg

325

330

335

Pro Pro Leu Gly Asp Arg Pro Ser Thr Pro Gly Ala Lys Pro Asn Ile

340 345 350
Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe
355 360 365
Val Phe Lys Asp Arg Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gln
370 375 380
Glu Gly Tyr Pro Met Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala
385 390 395 400
Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe
405 410 415
Lys Gly Asp Lys Tyr Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly
420 425 430
Tyr Pro His Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly
435 440 445
Ile Asp Thr Ala Leu Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe
450 455 460
Lys Gly Glu Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp
465 470 475 480
Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gln Ala
485 490 495

Pro Gln Gly Ala Phe Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Phe Tyr
500 505 510

Lys Gly Arg Asp Tyr Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu Ser Val Glu
515 520 525

Pro Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Lys Gln
530 535 540

Lys Glu Val Glu Arg Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val
545 550 555 560

Asp Ile Met Val Thr Ile Asp Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val
565 570 575

Ala Val Val Val Pro Cys Thr Leu Ser Leu Cys Leu Leu Val Leu Leu
580 585 590

Tyr Thr Ile Phe Gln Phe Lys Asn Lys Ala Gly Pro Gln Pro Val Thr
595 600 605

Tyr Tyr Lys Arg Pro Val Gln Glu Trp Val
610 615

<210> 6

<211> 645

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly Pro Pro Pro Pro

1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Gly Gln Ala Pro Arg Trp Ser Arg Trp Arg Val Pro

20 25 30

Gly Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Pro Gly

35 40 45

Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Asn Arg Ala Ala

50 55 60

Val Ala Val Ala Val Ala Arg Ala Asp Glu Ala Glu Ala Pro Phe Ala

65 70 75 80

Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Asp Ser

85 90 95

Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Ala Lys Ala Leu Gln Ser Ala Val Ser

100 105 110

Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gln

115 120 125

Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His

130 135 140

Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly

145	150	155	160
Gln Lys Trp Arg Gln Lys His Ile Thr Tyr Ser Ile His Asn Tyr Thr			
	165	170	175
Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala Ile Arg Gln Ala Phe			
	180	185	190
Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr			
	195	200	205
His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe			
	210	215	220
Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly			
	225	230	235
Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr			
	245	250	255
His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly Asn Ala Asn His Asp			
	260	265	270
Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu			
	275	280	285
Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr			
	290	295	300

Gln Tyr Met Glu Thr His Asn Phe Lys Leu Pro Gln Asp Asp Leu Gln
305 310 315 320

Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr
325 330 335

Arg Pro Leu Pro Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu
340 345 350

Arg Lys His Glu Arg Gln Pro Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp
355 360 365

Arg Pro Ser Thr Pro Gly Thr Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe
370 375 380

Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg
385 390 395 400

Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met
405 410 415

Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala
420 425 430

Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr
435 440 445

Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu
450 455 460

Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu

465 470 475 480

Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr

485 490 495

Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys

500 505 510

Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe

515 520 525

Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr

530 535 540

Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg

545 550 555 560

Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Asn Gln Lys Glu Val Glu Arg

565 570 575

Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr

580 585 590

Ile Asn Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val Ala Val Val Ile Pro

595 600 605

Cys Ile Leu Ser Leu Cys Ile Leu Val Leu Val Tyr Thr Ile Phe Gln

610

615

620

Phe Lys Asn Lys Thr Gly Pro Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro

625

630

635

640

Val Gln Glu Trp Val

645

<210> 7

<211> 4263

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (75)..(1928)

<400> 7

gcgggaggac ccggccggag ccgccgccgc cgccgccgcc atcgagccg ggcggccggg 60

ccccgccgc cggg atg ccg agg agc cgg ggc ggc cgc gct gcg ccg ggc 110

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly

1

5

10

cag gcc tcg cgc tgg agc ggc tgg cgg gcc ccg ggg cgg ctg ctg ccg 158

Gln Ala Ser Arg Trp Ser Gly Trp Arg Ala Pro Gly Arg Leu Leu Pro

15

20

25

ctg ctg ccc gcg ctc tgc tgc ctc gcg gcg gcg gcg ggg gcc ggg aag 206

Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Lys

30

35

40

ccg gcc ggg gcg gac gcg ccc ttc gct ggg cag aac tgg tta aaa tca 254

Pro Ala Gly Ala Asp Ala Pro Phe Ala Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser

45

50

55

60

tat ggc tat ctg ctt ccc tat gag tcg cgg gca tct gcg ttg cat tct 302

Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Glu Ser Arg Ala Ser Ala Leu His Ser

65

70

75

ggg aag gcc ttg cag tcc gcg gtc tcc act atg cag cag ttt tac ggg 350

Gly Lys Ala Leu Gln Ser Ala Val Ser Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly

80

85

90

atc cca gtc acc ggt gtg ttg gat cag aca aca atc gag tgg atg aag 398

Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gln Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys

95

100

105

aaa cct cga tgt ggc gtc cct gat cat ccc cac ttg agc agg agg agg 446

Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His Pro His Leu Ser Arg Arg Arg

110

115

120

aga aat aag cga tat gcc cta act gga cag aag tgg agg cag aaa cac 494

Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly Gln Lys Trp Arg Gln Lys His

125

130

135

140

atc acc tac agc att cac aat tat acc cca aag gtg ggt gag ctg gac 542

Ile Thr Tyr Ser Ile His Asn Tyr Thr Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp

145	150	155	
aca cgg aag gct att cgt cag gct ttc gat gtg tgg cag aag gtg act	590		
Thr Arg Lys Ala Ile Arg Gln Ala Phe Asp Val Trp Gln Lys Val Thr			
160	165	170	
cca ctg acc ttt gaa gag gtg cca tac cat gag atc aaa agt gac cgg	638		
Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr His Glu Ile Lys Ser Asp Arg			
175	180	185	
aag gag gca gac atc atg atc ttc ttt gct tct ggt ttc cat ggt gac	686		
Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe Ala Ser Gly Phe His Gly Asp			
190	195	200	
agc tcc cca ttt gat ggg gaa ggg gga ttc cta gcc cat gcc tac ttt	734		
Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe			
205	210	215	220
cct ggc cca ggg atc gga gga gac act cac ttt gat tca gat gaa ccc	782		
Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Asp Glu Pro			
225	230	235	
tgg acg cta gga aat gcc aac cat gat ggc aat gac ctc ttc ctg gtg	830		
Trp Thr Leu Gly Asn Ala Asn His Asp Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val			
240	245	250	
gcc gtg cat gaa ctg ggc cat gca ctg ggc ttg gag cac tct aat gac	878		
Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Asn Asp			
255	260	265	

ccc agt gct atc atg gct ccc ttc tac caa tac atg gag aca cac aac 926
 Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu Thr His Asn

270

275

280

ttc aag cta ccg cag gac gat ctc cag ggc atc cag aag att tac gga 974
 Phe Lys Leu Pro Gln Asp Asp Leu Gln Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly

285

290

295

300

ccc cca gct gag cct ctg gag ccc aca agg ccc ctc cat aca ctc ccg 1022
 Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu His Thr Leu Pro

305

310

315

gtc cgc agg atc cac tcg ccg tct gag agg aag cac gag cgg cac cca 1070
 Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu Arg Lys His Glu Arg His Pro

320

325

330

agg ccc cca cgg ccg ccc ctt ggg gac cgg cca tcc act cca ggt gcc 1118
 Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp Arg Pro Ser Thr Pro Gly Ala

335

340

345

aaa ccc aac atc tgc gat ggc aac ttc aac aca gtg gcc ctc ttc cga 1166
 Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg

350

355

360

ggg gag atg ttt gtg ttc aag gat cgc tgg ttc tgg cgc ctg cgc aat 1214
 Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn

365

370

375

380

aac cgg gtg cag gaa ggc tac ccc atg cag atc gaa cag ttc tgg aag 1262
Asn Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys

385

390

395

ggc ctg ccc gcc cgc ata gac gca gcc tat gaa aga gct gac ggg aga 1310
Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg

400

405

410

ttc gtc ttc ttc aaa gga gac aag tac tgg gtt ttc aaa gaa gtg acg 1358
Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr Trp Val Phe Lys Glu Val Thr

415

420

425

gtg gaa cct ggg tac ccc cac agc ttg ggg gag ctg gga agc tgc ctg 1406
Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu

430

435

440

ccc cgt gaa gga att gac aca gct ctg cgc tgg gaa cct gtg ggc aaa 1454
Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys

445

450

455

460

acc tac ttc ttc aaa ggc gaa cgg tac tgg cgc tac agc gag gag cgg 1502
Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg

465

470

475

cga gcc aca gac cct ggc tac ccc aag ccc atc acc gtg tgg aag ggc 1550
Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly

480

485

490

atc ccg cag gct ccg caa ggg gcc ttc atc agc aag gaa gga tat tac 1598

Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr
 495 500 505

acc tac ttc tac aaa ggc cgg gac tac tgg aag ttt gac aac cag aaa 1646
 Thr Tyr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys
 510 515 520

ctg agc gtg gag cca ggc tac cca cgc aac atc ctg cgt gac tgg atg 1694
 Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met
 525 530 535 540

ggc tgc aag cag aag gag gta gag cgg cgt aag gag cgg agg ctg ccc 1742
 Gly Cys Lys Gln Lys Glu Val Glu Arg Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro
 545 550 555

cag gat gat gtg gac atc atg gtg acc atc gat gac gtg cca ggc tct 1790
 Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr Ile Asp Asp Val Pro Gly Ser
 560 565 570

gtg aac gct gtg gct gtg gtt gtc ccc tgc aca ctg tcc ctc tgc ctc 1838
 Val Asn Ala Val Ala Val Val Val Pro Cys Thr Leu Ser Leu Cys Leu
 575 580 585

ctg gtg ctg ctc tac act atc ttc caa ttc aag aac aag gcg ggt cct 1886
 Leu Val Leu Leu Tyr Thr Ile Phe Gln Phe Lys Asn Lys Ala Gly Pro
 590 595 600

cag ccc gtc acc tac tat aag cgg ccg gtc cag gag tgg gta 1928
 Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro Val Gln Glu Trp Val

605

610

615

tgagcagccc agagccctct ctgtctaccc ggtctggcca gccaggccct tcctcaccag 1988

ggtctgaggg gcagctctag ccactgccc ctggggccag cagggctaag gcagggttcg 2048

tgtgtagctg aagtgggtgg tgcactggtc taggctgagt gcggggctgg gagtgatggt 2108

ggctatgccc aggttgggta gctggcacc agctgccagc ctctgtcct gggcagacct 2168

ctctctactc aagggaatag gccaggccct gtcaggagtc aaggatggtg ccaggaggtg 2228

cccctgaggt cattgcatcc tgttggtgtct gcaagatacc acagctccag tcctggctgg 2288

gaccagccc tctgaggcaa gccagcacta gctctcacc caccacaaga tgccaccaat 2348

cccagtcctc tctgccaaca cctgtgtggtc agatgtcccc tcctccctac cctactatcc 2408

tccaaggctg cagtgcctct gatgccaaca gagtgggcaa aagcctgggt ttcccctgct 2468

agcccataga gagattcctc aggaaacctg ttccaccgt caggctcct ctgagactca 2528

gaacttaggg tcacatgctg caggcaaggc tgtggccagc tggatctcac aaggaccag 2588

ctgtcatgtc gtgaatattt aaatgtcctg tcactactgt ttaaagtccc attttgcaa 2648

ggctacttga ggcttaggt cagctagagg tgactgtctt ggtgatgagg ccagtatggt 2708

ggcccttccc cgggcactaa ggaccacggt gctgcaaagg ccactcgggc atcctgatac 2768

tagcgggcat ccgttcagg aggtcaaca gctacaggag ctgacctgg ttctgggggc 2828
ggatgcaagt ttgtgacct tctctactcc cctcattaa tgttgcccc tgccctgctc 2888
cagcctgtcc tctgtggcct gggggctcgg cctgactaca ggtaaagcag agaggattct 2948
agagccaccc ttgtcatctt ctcagagtaa gggaccaggg cagccttta agttctccat 3008
ctacatcccc agtgacctg aggcaactca gctccagcct ggagtcggtg tttgtgctcc 3068
tatcttgacc ctggcagccc aggtctctgg gtccatcttc ctgcactgct cttaggaaaa 3128
gggtcctctt ccagctggg agcagcccca ggctttggg tttccccaa ctcctaacc 3188
caaaactacct tttgttgtt tgttttaacc tgaggccctt cttcacatct gacagttcct 3248
aagtcttggg ttggcttgct ccaaaaccac tgggtgcaag tgtcactcac tggtctcttg 3308
ccaaacccaa cgggtgtacg aggcggccat caagtgcta gtgggtcaca gataccaact 3368
ctgacctctg agcctgcatg ggctttgccc ctgccctgtg gtctctgccc ctgtagcaca 3428
gacagagact ctgatgccc tgggagttgt tgagtaaaat ctctgtccc agaagcacct 3488
atgtgggtcc actgtgccc atctacccat tgtgttcttg ctcatcttg ccaagggcag 3548
gtccctggg gcaggcggg aacaactgca gagatttagt gattcatagg tttgtacagc 3608

gtttatatact ttgcaaagca ctttatttagc tcacagctgt ccactcacat gaaactcctg 3668
taggctctga gagaggctga gggtagcact catcttacct tcagatgaag cacaaggagg 3728
tcttattatc tgccctgcc atccaggtag ccctggctgg gtcttgtgtc cccatcagt 3788
ggcccttcca gggtccaaga aaactgtctc ttctagtcct ctcctctggg cctccctccc 3848
ccagtcacct ggctccctctc ctccaggttg tgctcacttc ttgaaagtc taggccccgc 3908
aggctccctg ttggctcctg gcattccaag gccagttgcg aaagagcagg ggatggaggc 3968
aggcagccca ggctgcagat gtgagggaca cagggccggg cccagagagg gctcagccta 4028
gaggcttcca atcttgatt ctctgcctg cggtcactg ttgtccatc agcccaggtc 4088
agagcagtca gaggggcaaa gtactggagc cccagagct cagcttcccc tcggcctggg 4148
tgacatcaca gcattcagt gtcggtcaca ttttaactg atcagccttt gtacaatgtt 4208
ttttaaata tttctaaata aaacagaaat acagtgttaa aaaaaaaaaa aaaaa 4263

<210> 8

<211> 2620

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1935)

<400> 8

atg ccg agg agc cgg ggc ggc cgc gcc gcg ccg ggg ccg ccg ccg ccg 48
Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly Pro Pro Pro Pro

1 5 10 15

ccg ccg ccg ccg ggc cag gcc ccg cgc tgg agc cgc tgg cgg gtc cct 96
Pro Pro Pro Pro Gly Gln Ala Pro Arg Trp Ser Arg Trp Arg Val Pro

20 25 30

ggg cgg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ccc gcg ctc tgc tgc ctc ccg ggc 144
Gly Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Pro Gly

35 40 45

gcc gcg cgg gcg gcg gcg gcg gcg ggc gca ggg aac ccg gca gcg 192
Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Asn Arg Ala Ala

50 55 60

gtg gcg gtg gcg gtg gcg cgg gcg gac gag gcg gag gcg ccc ttc gcc 240
Val Ala Val Ala Val Ala Arg Ala Asp Glu Ala Glu Ala Pro Phe Ala

65 70 75 80

ggg cag aac tgg tta aag tcc tat ggc tat ctg ctt ccc tat gac tca 288
Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Asp Ser

85 90 95

cgg gca tct gcg ctg cac tca gcg aag gcc ttg cag tcg gca gtc tcc 336
Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Ala Lys Ala Leu Gln Ser Ala Val Ser

100	105	110	
act atg cag cag ttt tac ggg atc ccg gtc acc ggt gtg ttg gat cag			384
Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gln			
115	120	125	
aca acg atc gag tgg atg aag aaa ccc cga tgt ggt gtc cct gat cac			432
Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His			
130	135	140	
ccc cac tta agc cgt agg cgg aga aac aag cgc tat gcc ctg act gga			480
Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly			
145	150	155	160
cag aag tgg agg caa aaa cac atc acc tac agc att cac aac tat acc			528
Gln Lys Trp Arg Gln Lys His Ile Thr Tyr Ser Ile His Asn Tyr Thr			
165	170	175	
cca aaa gtg ggt gag cta gac acg cgg aaa gct att cgc cag gct ttc			576
Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala Ile Arg Gln Ala Phe			
180	185	190	
gat gtg tgg cag aag gtg acc cca ctg acc ttt gaa gag gtg cca tac			624
Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr			
195	200	205	
cat gag atc aaa agt gac cgg aag gag gca gac atc atg atc ttt ttt			672
His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe			
210	215	220	

gct tct ggt ttc cat ggc gac agc tcc cca ttt gat gga gaa ggg gga 720
 Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly
 225 230 235 240

ttc ctg gcc cat gcc tac ttc cct ggc cca ggg att gga gga gac acc 768
 Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr
 245 250 255

cac ttt gac tcc gat gag cca tgg acg cta gga aac gcc aac cat gac 816
 His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly Asn Ala Asn His Asp
 260 265 270

ggg aac gac ctc ttc ctg gtg gct gtg cat gag ctg ggc cac gcg ctg 864
 Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu
 275 280 285

gga ctg gag cac tcc agc gac ccc agc gcc atc atg gcg ccc ttc tac 912
 Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr
 290 295 300

cag tac atg gag acg cac aac ttc aag ctg ccc cag gac gat ctc cag 960
 Gln Tyr Met Glu Thr His Asn Phe Lys Leu Pro Gln Asp Asp Leu Gln
 305 310 315 320

ggc atc cag aag atc tat gga ccc cca gcc gag cct ctg gag ccc aca 1008
 Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr
 325 330 335

agg cca ctc cct aca ctc ccc gtc cgc agg atc cac tca cca tcg gag 1056
Arg Pro Leu Pro Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu

340

345

350

agg aaa cac gag cgc cag ccc agg ccc cct cgg ccg ccc ctc ggg gac 1104
Arg Lys His Glu Arg Gln Pro Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp

355

360

365

cgg cca tcc aca cca ggc acc aaa ccc aac atc tgt gac ggc aac ttc 1152
Arg Pro Ser Thr Pro Gly Thr Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe

370

375

380

aac aca gtg gcc ctc ttc cgg ggc gag atg ttt gtc ttt aag gat cgc 1200
Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg

385

390

395

400

tgg ttc tgg cgt ctg cgc aat aac cga gtg cag gag ggc tac ccc atg 1248
Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met

405

410

415

cag atc gag cag ttc tgg aag ggc ctg cct gcc cgc atc gac gca gcc 1296
Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala

420

425

430

tat gaa agg gcc gat ggg aga ttt gtc ttc ttc aaa ggt gac aag tat 1344
Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr

435

440

445

tgg gtg ttt aag gag gtg acg gtg gag cct ggg tac ccc cac agc ctg 1392

Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu

450

455

460

ggg gag ctg ggc agc tgt ttg ccc cgt gaa ggc att gac aca gct ctg 1440

Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu

465

470

475

480

cgc tgg gaa cct gtg ggc aag acc tac ttt ttc aaa ggc gag cgg tac 1488

Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr

485

490

495

tgg cgc tac agc gag gag cgg cgg gcc acg gac cct ggc tac cct aag 1536

Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys

500

505

510

ccc atc acc gtg tgg aag ggc atc cca cag gct ccc caa gga gcc ttc 1584

Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe

515

520

525

atc agc aag gaa gga tat tac acc tat ttc tac aag ggc cgg gac tac 1632

Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr

530

535

540

tgg aag ttt gac aac cag aaa ctg agc gtg gag cca ggc tac ccg cgc 1680

Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg

545

550

555

560

aac atc ctg cgt gac tgg atg ggc tgc aac cag aag gag gtg gag cgg 1728

Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Asn Gln Lys Glu Val Glu Arg

565

570

575

cgg aag gag cgg cgg ctg ccc cag gac gac gtg gac atc atg gtg acc 1776
 Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr

580

585

590

atc aac gat gtg ccg ggc tcc gtg aac gcc gtg gcc gtg gtc atc ccc 1824
 Ile Asn Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val Ala Val Val Ile Pro

595

600

605

tgc atc ctg tcc ctc tgc atc ctg gtg ctg gtc tac acc atc ttc cag 1872
 Cys Ile Leu Ser Leu Cys Ile Leu Val Leu Val Tyr Thr Ile Phe Gln

610

615

620

ttc aag aac aag aca ggc cct cag cct gtc acc tac tat aag cgg cca 1920
 Phe Lys Asn Lys Thr Gly Pro Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro

625

630

635

640

gtc cag gaa tgg gtg tgagcagccc agagccctct ctatccactt ggtctggcca 1975
 Val Gln Glu Trp Val

645

gccaggccct tctcaccag ggtctgaggg gcagctctgg ccagtgtca ccagggccag 2035

cagggcccta ggctggggtc gtacagctga agttgtgggt gcattggcct aggctgagcg 2095

tggggcaggg aattatgggg gctgtgccca ggggtgggtgt ctggcaccca gctgccagcc 2155

ttctgtcttg ggcaactac tccctactta agggaatagg ccaggctcca tccggaggca 2215

gggacccatgc caggaggagc ccctgtggtc acggcatcct gtgggtgtcca tgaggtacca 2275

cagctccact cctggctgga acccggcacc ctctgtggga agccagcact agctctcacc 2335

ccccatccgg gagataccac cagtcctggt ccccttttgc caacacctgc tggtcagatg 2395

tccccctacc cccacccac tgcctccaa ggctacagga cccctgcttc tgacacagtg 2455

agcaacaagc ctgggtttcc ctgctggcag acggcagatc cctcaggaaa cctgctccac 2515

ttgtcagggt ctcttcggag acccaggatt tagggtcaca tgctgcaggc agggctgtgg 2575

cccagctggg tctgacaagg acccgtgtca catcgtgaat attta 2620

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

ggttcctctt gtccacttg g

21

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gtaggaattc gggttgtagg gaggtcgaca ttgcc

35

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ggcaatgtcg acctccctac aac

23

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ggagctgtct aaggccatca ca

22

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

ctccctacaa cccgaattcc tac

23

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

cttgtgggca gatagggggc

20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

cgcgccgagg acctcagcct g

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

ggttcctctt gttccacttg g

21

<210> 17

<211> 2295

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

aagagacaag aggtgccttg tgggcagata gggggctggg agggggcctg cccggaagca 60

gtggtggccc gtggcaggct tctcactggg taggaccggg ccctctgttg cccccctca 120
ccctgctctc tgcctcagg agtggctaag caggttcggg tacctgcccc cggctgacct 180
cacaacaggg cagctgcaga cgcaagagga gctgtctaag gccatcacag ccatgcagca 240
gtttggtggc ctggaggcca cgggcatcct ggacgaggcc accctggccc tgatgaaaac 300
cccacgtgc tccctgccag acctccctgt cctgaccag gctcgcagga gacgccaggc 360
tccagcccc accaagtga acaagaggaa cctgtcgtgg agggtcgga cgttcccacg 420
ggactcacca ctggggcacg acacggtgcg tgcactcatg tactacgccc tcaaggtctg 480
gagcgacatt gcgcccctga acttcacga ggtggcgggc agcaccgccc acatccagat 540
cgacttctcc aaggccgacc ataacgacgg ctaccccttc gacgcccggc ggcaccgtgc 600
ccacgccttc tccccggcc accaccacac cgccgggtac acccacttta acgatgacga 660
ggcctggacc ttccgtcct cggtatgccc cgggatggac ctgtttgcag tggctgtcca 720
cgagtttggc cagccattg ggttaagcca tgtggccgct gcacactcca tcatgcggcc 780
gtactaccag ggcccgggtg gtgaccgct gcgctacggg ctcccctacg aggacaaggt 840
gcgcgtctgg cagctgtacg gtgtgcggga gtctgtgtct cccacggcgc agcccagga 900

gcctccccctg ctgccggagc ccccagacaa ccggtccagc gccccgcccc ggaaggacgt 960

gccccacaga tgcagcactc actttgacgc ggtggcccag atccgggggtg aagctttctt 1020

cttcaaaggc aagtacttct ggcggtgac gcgggaccgg cacctgggtg ccctgcagcc 1080

ggcacagatg caccgcttct ggcggggcct gccgtgcac ctggacagcg tggacgccgt 1140

gtacgagcgc accagcgacc acaagatcgt cttctttaaa ggagacaggt actgggtgtt 1200

caaggacaat aacgtagagg aaggataccc gcgccccgtc tccgacttca gcctcccgcc 1260

tggcggcatc gacgctgcct tctcctgggc ccacaatgac aggacttatt tctttaagga 1320

ccagctgtac tggcgctacg atgaccacac gaggcacatg gaccccggct accccgcccc 1380

gagccccctg tggaggggtg tccccagcac gctggacgac gccatgcgct ggtccgacgg 1440

tgcctcctac ttcttccgtg gccaggagta ctggaaagtg ctggatggcg agctggaggt 1500

ggcaccgggg taccacagt ccacggcccc ggactggctg gtgtgtggag actcacaggc 1560

cgatggatct gtggctgcgg gcgtggacgc ggcagagggg ccccgcgccc ctccaggaca 1620

acatgaccag agccgctcgg aggacgggta cgaggctcgc tcatgcacct ctggggcatc 1680

ctctcccccg ggggccccag gccacttgt ggctgccacc atgtgtctgc tgctccgcc 1740

actgtcacca ggcgccctgt ggacagcggc ccaggccctg acgtatgac acacagcgcg 1800

agcccatgag aggacagagg cggtagggaca gcctggccac agagggaag gactgtgccg 1860

gagtccttg gggagggtgtt ggcgcgggat gaggacgggc caccctggca ccggaaggcc 1920

agcagagggc acggcccgc agggctgggc aggcacaggt ggcaaggac gagctgtccc 1980

ctagttaggg actgtgtga ctgacgagcc gaggggtggc cgctccagaa gggtagccag 2040

tcaggccgca ccgccccag cctcctccgg cctggaggag agcatctcgg gctgggggcc 2100

caccctctc tgtgccggcg ccaccaaccc caccacact gctgcctggt gctcccgccg 2160

gcccacaggg cctccgtccc caggccccca gtggggcagc cctccccaca gacgagcccc 2220

ccacatggtg ccgcggcacg tccccctgt gacgcgttcc agaccaacat gacctctccc 2280

tgctttgtag cggcc 2295

<210> 18

<211> 4014

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (3148)..(3280)

<220>

<221> exon

<222> (3564)..(3633)

<400> 18

tctgttggg ggtccctgg caaactagga agtgggtccc accctctcac tccagcccc 60
aagacggccc ctcccaggat gcctagcctg agatttgggg cacarccctt gagcacaac 120
tcgtgttagg taggaggcac ccaccagccc tgccccacag acccaccacc cccaagatt 180
cgatgccatt ctatgctcaa attccagtgc ctccctggggc cacaggcgac agtgccgtgt 240
tatcatgggc ggggctgcct gtcccgggct ggtgccgggg ccttggttct atgagttgaa 300
gcaggctggc cgctcacacc tgcaactaaa ccacctgctt ccaaacattg ggcaacattc 360
cacagccact gggagtgtctg cctgccaggc ccggtccac tttcctgaaa tgcatgtggc 420
ctcgtggcca ggctgcccag ctccctgggg accagagtgg ggggtgcccc aaaccggcac 480
cgtgaacccc acagagtaaa tgggccactc agtgcagcta ccagccatga cctcagctta 540
tagacgggaa ggctgggggg tgagttgtcc tccaagggg tctcagcacc tgctggccca 600
accaggcag cagctggcct ggggtgggaaa ggcacctgcc tgtgtggacc ctccctggt 660
gagggggcag ggggtcatca tccaatatca tagatgatgt gaggaaactc cagagtgttt 720
cctggaggag gtgacaggct attgtaacca tgaggcacag tggccctgtt gagctgtgat 780

cttaacaaag gactaaaaag tgcagaatgt gctgatgggc atctccagca cctacagcgg. 840
tgactgatca tgggacaccc tcagtaaacc ctgcagggtgc aaggtagtgt gggaccggat 900
gctcggggcc aaagatcccc acaccctgga ggtcagggcg gaagtgggag gccagcttgt 960
caaggccaag gctgtcacc ccaaggcccc tccagagaag ctgcccacc cagtcatgaa 1020
cgteccatgt gacgtcctgt cgtgcctata gctttggagg ggccccagt tctgtacaca 1080
ctcttggctt cccaagggg ctgaggggct gggctgggtc agtaggggtt ggaaagggg 1140
taaaggcaca gaggggggccc ccgggaagga ctcagtgtt cctggaaggg gaatctcggg 1200
gtgtgcagat cccatgtagt gtcttgtgag gccctcctg gccagcacgs cctgttgctg 1260
atgcccctgg gacttccagg atgggtgtgc ctattccct ctgagcactg cctgctgkgt 1320
gggcaggagg gttggccagg accaccccat caccagctcc tgcagaccag aacctggagg 1380
cccagcaggt ggcataawtg agtcacaagc attttctttt ttcttttcc tttttttt 1440
tttaggattt ctttaaaaag ttatgtttt ttcatattat catttttta ggtaagcca 1500
catgaaacta ctagtattta ttttaaatca gaaatggtca aaaatgggca cttcatatg 1560
atttggccaa tgaatacatg agagggtgta aataatagcg attcacaagc attttctaaa 1620

tgtccaggga aaaaaaaaaag acaggtttgc aggcaggga gagccccag cacatcaccc 1680
ctggcttgta cttttctgga gccgcctca cccctgctgt gggtccctgg gctggcgagt 1740
atccacaggg cagagcagca gcttcattgc agcctgcaag tgggcacagg cgccatttgg 1800
cggttgaaga aactgaagct aggggtggag gtagcccca cagatggcac ccaggcctgc 1860
catccccagg tccccacgat ggcacccagg tccccacaga tggcatccag gccccctgt 1920
ccccagggcc cctccagggt agcagagatg actggggcat ggggccaggg ctgtatttat 1980
gcccaggta aagggtgcc ctcatctcgt ctctactca gctccggtgt gggtagcctt 2040
gcacccacc cagtgggcc ttcagagcag agctgtcccc tgcgccagg gctggtgtga 2100
acattttcca cgtcctggct cacgtcctca tcaccagcct gcccaaggact ctgaggaagg 2160
agcccagagg ggtggactgc cttgccccag gcacacagcg gggagggtgc tgagtgggat 2220
ttgaacctag gcagcctggc tggaacctgg cttttgtttc tgagacagg tctcgtctgt 2280
ttgcagacac agtctgcaac tctgtgtc aaacgatcct cccgcctcag cctcccaaag 2340
tgctgggatc tcaggcataa gccacagcac cggccaagcc tgggtcttta tctccccat 2400
gaatgtatag catggcccaa ttccttaaac tgggtgtctga gccacagcct ttcacagctg 2460
gggtcccaga ccttggtatgc tagacttccc tgtcacaagt cagctgagag cctgcatttg 2520

acactggcca catttaagag cttttgaag gtccctagc attttgcggc ctcaggagc 2580
gtggggtggg gcagggttgc catgagtgtg tgtacaggc gtgcacggc caagtcaca 2640
ccatctaagg gacatcagat ttatttattt attcattttt tagatggagt ctgctctgt 2700
cgcccaggct ggagtgcagt ggcacgatct cggctcactg caagctccg ctcctgggt 2760
cccac̄cactc tcctgcytca gcctcccag tagctgggac tacaggcacc tgccaccaca 2820
cccgctaata tttttgtatt tttagtagag acggggtttc accatattag ctaggatgt 2880
ctccatctcc tgacctcatg atccgcctgc ctcggcctcc caaacctctg ggattacagg 2940
cgtgagccac agcaccggc caggacatc aggtttatta agacactttt ccggcagctg 3000
cccagggaag agacagagag gtgccttgtg ggcagatagg gggctgggag ggggcctgcc 3060
cggaagcagt gtggcccgt ggcaggcttc tactgggta ggaccgggc ctcgttgca 3120
ccccctacc ctgctctctg ccctcaggag tggctaagca ggttcggta cctgccccg 3180
gbtgaccca caacaggga gctgcagac caagaggagc tgtctaaggc catcacagc 3240
atgcagcagt ttkgtggcct ggaggchacc ggcaccttgg gtcagttctc cagggggcag 3300
cgggagcgcc gtgsc̄cccg tcaggtctgc gccgctcgc catgccccct ctgatcaggc 3360

acagtcccg tttatgcttg aatgaacctg ggtcctggcc tggtagct cagagcctgg 3420
ggctgggtccc ccaaagatga cgtgggagga gggsgcggt cggaggctgg tgccagagtc 3480
aggctcccg ccttggggat gtcgggac ctaggtggg gagtgagctg ggctaggctc 3540
tgagctccat gctttccctg cagacgagc caccttggcc ctgatgaaa cccacgctg 3600
ctccctgcca gacctccct gtcctgacm caggtctcg agggagacgc acaggtctcm 3660
cagccccmm mcaagtggac acagagagga acctgtcgt gaggtgggtg cgtggccagg 3720
gtgaggagcg gggcctccgt ggagggtggc gcgtggccag ggtgaggaac ggggtctccg 3780
tggagggtgg cgcgtggcca ggggtgggaa cgggtcttc gtgaggcgg gtgcgtggcc 3840
agggtgagga acaggtctc cgtggaggtg ggcgcgtggc cagggtgggg aacgggtct 3900
ccgtggaggc ggggtcgtgg ccagggtgag ggtggggcc cccatgtctc cgtgtctggg 3960
cctgtgtag atatcaagct tatcgatacc gtcgacctg agggggghcc gtac 4014

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

aatctcccat cggccctttc a

21

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

atgcacggcc accaggaaga

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

ggatcagaca acgatcgagt

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

cagcttgaag ttgtgcgtct

20

<210> 23

<211> 17

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 1

<223> partial amino acid sequence of MT5-MMP, Xaa=N^α-acetylproline

<400> 23

Xaa Val Thr Gly Val Leu Asp Gln Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys

1 5 10 15

Cys

<210> 24

<211> 19

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 1

<223> partial amino acid sequence of MT5-MMP, Xaa=N^α-acetylhistidine

<400> 23

Xaa Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe

1 5 10 15

Ala Ser Cys

<210> 25

<211> 18

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 1

<223> partial amino acid sequence of MT5-MMP, Xaa=N^α-acetylleucine

<400> 25

Xaa Pro Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu Arg Lys His Glu Arg

1

5

10

15

Gln Cys

<210> 26

<211> 17

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<223> partial amino acid sequence of MT5-MMP

<400> 26

Cys Asn Gln Lys Glu Val Glu Arg Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln

1

5

10

15

Asp

<210> 27

<211> 20

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<223> partial amino acid sequence of MT5-MMP

<400> 27

Cys Asn Lys Thr Gly Pro Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro Val

1

5

10

15

Gln Glu Trp Val

20

<210> 28

<211> 8

<212> P R T

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<223> FLAG epitope

<400> 28

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05350

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DDBJ/EMBL/GenBank/GeneSeq
Swissprot/PIR/GeneSeq
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Cancer Research, Vol. 56 (1996), Xose S. Puente et al., "Molecular Cloning of a Novel Membrane-type Matrix Metalloproteinase from a Human Breast Carcinoma", pages 944-949	1-4, 9-16 5-8, 17-20
X A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 15 (1997), Shofuda K. et al., "Expression of Three Membrane-type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Rat Vascular Smooth Muscle Cells and Characterization of MT3-MMPs with and without Transmembrane Domain", Pages 9749-9754	5-12, 17-20 1-4, 13-16
X A	JP, 10-210982, A (Fuji Chemical Industries, Ltd.), 11 August, 1998 (11.08.98) (Family: none)	5-12, 17-20 1-4, 13-16
P, X P, A	EP, 875577, A2 (Smithkline Beecham Corporation), 04 November, 1998 (04.11.98) & US, 5837508, A & JP, 10-313878, A	5-12, 17-20 1-4, 13-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
21 December, 1999 (21.12.99)Date of mailing of the international search report
28 December, 1999 (28.12.99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05350

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X P, A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, No. 13 (Mar.1999), Duamqomg Pei et al., "Identification and Characterization of the Fifth Membrane-type Matrix Metalloproteinase MT5-MMP", pages 8925-8932	5-12, 17-20 1-4, 13-16
P, X P, A	Cancer Research, Vol. 59 (June 1999), Elena Liano et al., "Identification and Characterization of Human MT5-MMP, a New Membrane-bound Activator of Progelatinase A Overexpressed in Brain Tumors", pages 2570-2576	5-12, 17-20 1-4, 13-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05350

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions as set forth in claims 1 to 20 have a matter in common of "an antibody recognizing a transmembrane matrix metalloprotease".

However "an antibody recognizing a transmembrane matrix metalloprotease" is not a novel one (there have been already known a plural number of transmembrane matrix metalloproteases). Therefore, it is not a special technical feature in the meaning as specified in the second sentence in Rule 13.2 of the Regulations under the PCT, namely, a technical feature clearly indicating that the inventions as a whole contribute to the prior art.

Accordingly, there is no technical relevancy among the inventions relating to the antibodies recognizing the polypeptides comprising the sequences represented by SEQ ID NOS: 1 and 2 and 5 and 6. Such being the case, the inventions do not comply with the requirement of unity of invention.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05350

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53, A61K39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DDBJ/EMBL/GenBank/GeneSeq

Swissprot/PIR/GeneSeq

BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Cancer Research Vol. 56 (1996) Xose S. Puente et al. "Molecular Cloning of a Novel Membrane-type Matrix Metalloproteinase from a Human Breast Carcinoma" p. 944-949	<u>1-4, 9-16</u> <u>5-8, 17-20</u>
<u>X</u> A	The Journal of Biological Chemistry Vol. 272 No. 15 (1997) Shofuda K. et al. "Expression of Three Membrane-type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Rat Vascular Smooth Muscle Cells and Characterization of MT3-MMPs with and without Transmembrane Domain" p. 9749-9754	<u>5-12, 17-20</u> <u>1-4, 13-16</u>
<u>X</u> A	JP, 10-210982, A (富士薬品工業株式会社) 11.8月. 1998 (11.08.98) (ファミリーなし)	<u>5-12, 17-20</u> <u>1-4, 13-16</u>

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.12.99

国際調査報告の発送日

28.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4 B

9 5 4 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>P, X</u> <u>P, A</u>	EP, 875577, A2 (Smithkline Beecham Corporation) 4. 11月. 1998 (04. 11. 98) & US, 5837508, A & JP, 10-313878, A	<u>5-12, 17-20</u> <u>1-4, 13-16</u>
<u>P, X</u> <u>P, A</u>	The Journal of Biological Chemistry Vol. 274 No. 13 (Mar. 1999) Duamqong Pei et al. "Identification and Characterization of the Fifth Membrane-type Matrix Metalloproteinase MT5-MMP" p. 8925-8932	<u>5-12, 17-20</u> <u>1-4, 13-16</u>
<u>P, X</u> <u>P, A</u>	Cancer Research Vol. 59 (June 1999) Elena Liano et al. "Identification and Characterization of Human MT5-MMP, a New Membrane-bound Activator of Progelatinase A Overexpressed in Brain Tumors" p. 2570-2576	<u>5-12, 17-20</u> <u>1-4, 13-16</u>

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1-20に係るそれぞれの発明に共通の事項は、「膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドを認識する抗体」である。

しかし「膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドを認識する抗体」は新規ではないから (既に複数の膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドが知られている)、これはPCT規則13.2の第2文の意味において、特別な技術的特徴、すなわち各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴でない。

したがって、配列番号1-2, 5-6で示される配列からなるポリペプチドを認識する抗体に係るそれぞれの発明の間にPCT規則13.2の意味における技術的な関係はなく、発明の単一性の要件は満たされていない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)